

**ÜBER VERSUCHE ZUR QUALITATIVEN  
NIKOTINBESTIMMUNG IM RAUCHERBLUT  
UND ZUM QUANTITATIVEN  
POLAROGRAPHISCHEN NIKOTINNACHWEIS  
IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN**

**(Voruntersuchungen zur Erarbeitung einer quantitativen  
polarographischen Analysenmethode für Nikotin  
im Raucherblut)**

Renate Müller

1964



Aus dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin in  
Frankfurt/Main

Direktor: Professor Dr. Gerchow

ÜBER VERSUCHE ZUR QUALITATIVEN NIKOTINBESTIMMUNG  
IM RAUCHERBLUT UND ZUM QUANTITATIVEN POLAROGRA-  
PHISCHEN NIKOTINNACHWEIS IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN

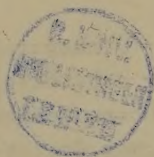
(Voruntersuchungen zur Erarbeitung einer  
quantitativen polarographischen Analysen-  
methode für Nikotin im Raucherblut)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
der hohen medizinischen Fakultät der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

vorgelegt von  
Renate Müller  
aus Zeitz/Elster

Frankfurt/Main 1964



Dekan: Prof. Dr. J. Frey  
Referent: Prof. Dr. J. Gerchow  
Korreferent: Prof. Dr. P. Holtz  
Mündliche Prüfung: 29. Juli 1964

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A. Einleitung und Problemstellung . . . . .                                                                                  | 1  |
| B. Versuche zur qualitativen Nikotinbestimmung in wässrigen Lösungen mit der Röntgen . . . . .                               | 3  |
| I. Streuung von Röntgenstrahlen auf Papierchromatogrammen . . . . .                                                          | 3  |
| II. Papierchromatographischer Nachweis von Nikotin in Ursubstanz . . . . .                                                   | 3  |
| III. Papierchromatographie auf gepufferten Papieren . . . . .                                                                | 4  |
| C. Versuche zur Streuung von Nikotin aus der Nikotin verdünnten Elektrolyten . . . . .                                       | 5  |
| I. Versuche zur Trennung des Alkaloids von Salzen . . . . .                                                                  | 5  |
| II. Röntgenbestimmung des Nikotins und Nikotinsäure durch Bestimmung der Viskosität und polarographische Nachweise . . . . . | 7  |
| III. Versuche über die qualitativen Nikotin-nachweise in Elektrolyten und Lösung des . . . . .                               | 9  |
| D. Versuche zur polarographischen qualitativen Nikotin-nachweise in wässrigen Lösungen . . . . .                             | 11 |
| I. Versuche zur Bestimmung der Elektrodenpotentiale und Anfertigung von Elektroden . . . . .                                 | 13 |
| II. Elektrodenversuche an Papierchromatogrammen und Anfertigung von Elektroden . . . . .                                     | 15 |
| E. Diskussion der Ergebnisse . . . . .                                                                                       | 21 |
| F. Zusammenfassung . . . . .                                                                                                 | 21 |
| G. Anhang . . . . .                                                                                                          | 25 |
| I. Polarographische Kurven . . . . .                                                                                         | 25 |
| II. Statistische Auswertung der Elektroden . . . . .                                                                         | 31 |
| Literaturverzeichnis . . . . .                                                                                               | 35 |
| Inhaltsverzeichnis . . . . .                                                                                                 | 37 |



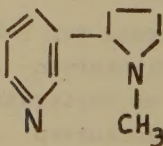
# G l i e d e r u n g

|                                                                                                                                                             | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. Einleitung und Problemstellung . . . . .                                                                                                                 | 1     |
| B. Versuche zum qualitativen Nikotinnachweis in wäßrigen<br>Lösungen und im Harn . . . . .                                                                  | 3     |
| I. Erprobung von Farbreagenzien auf Papierchromatogrammen . . . . .                                                                                         | 3     |
| II. Papierchromatographischer Nachweis von<br>Nikotin in Harnextrakten . . . . .                                                                            | 3     |
| III. Papierchromatographie auf gepufferten<br>Papieren . . . . .                                                                                            | 4     |
| C. Versuche zur Abtrennung des Nikotins aus mit Nikotin<br>versetzten Blutproben . . . . .                                                                  | 6     |
| I. Vorversuche zur Trennung des Alkaloids von<br>Ballaststoffen . . . . .                                                                                   | 6     |
| II. Dialyse von Blutproben, Anreicherung des Nikotins<br>durch Perforation der Dialysate und<br>papierchromatographische Auswertung der Perforate . . . . . | 8     |
| III. Versuchsbeispiel zum qualitativen Nikotinnachweis<br>im Raucherblut und Messung des<br>UV-Spektrums . . . . .                                          | 9     |
| D. Versuche zum polarographischen quantitativen Nikotinnachweis<br>in wäßrigen Lösungen . . . . .                                                           | 13    |
| I. Versuche zur Methodik der Polarographie und<br>Anfertigung von Eichkurven . . . . .                                                                      | 13    |
| II. Elutionsversuche an Papierchromatogrammen und<br>Anfertigung von Eichkurven . . . . .                                                                   | 18    |
| E. Diskussion der Ergebnisse . . . . .                                                                                                                      | 21    |
| F. Zusammenfassung . . . . .                                                                                                                                | 27    |
| G. Anhang . . . . .                                                                                                                                         | 28    |
| I. Polarographische Kurven . . . . .                                                                                                                        | 29    |
| II. Statistische Auswertung der Eichkurven . . . . .                                                                                                        | 34    |
| Literaturverzeichnis . . . . .                                                                                                                              | 42    |
| Lebenslauf                                                                                                                                                  |       |

ÜBER VERSUCHE ZUR QUALITATIVEN NIKOTINBESTIMMUNG  
IM RAUCHERBLUT UND ZUM QUANTITATIVEN POLAROGRA-  
PHISCHEN NIKOTINNACHWEIS IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN

(Voruntersuchungen zur Erarbeitung einer  
quantitativen polarographischen Analysen-  
methode für Nikotin im Raucherblut)

N i k o t i n ( C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> )



1-methyl-2- [pyridyl-(3')] -pyrrolidin

Molekulargewicht: 162

## A. E i n l e i t u n g   u n d   P r o b l e m s t e l l u n g

Es ist bekannt, daß zahlreiche Genußmittel, wie z.B. Alkohol, Koffein und Nikotin, einen Einfluß auf die allgemeine Leistungsfähigkeit des Kraftfahrers ausüben. Für die verkehrsmedizinische Praxis ist besonders die Wirkung des Nikotins auf das Gefäßsystem wichtig. F. EICHHOLTZ (1) und F. KAINDL (2) weisen darauf hin, daß die receptorische Leistung des Auges durch Nikotin herabgesetzt wird. Nach erstgenanntem Autor soll insbesondere die Dunkelanpassung durch Nikotin gestört werden. Im Gegensatz dazu stellte aber kürzlich H. BOCK (3) im Rahmen verkehrsmedizinischer Untersuchungen bei Rauchern am Comberg-Nyktometer eine Verbesserung der zentralen Dunkeladaptation nach Zigarettengenuß fest. Angaben über die zur Zeit des Tests im Blut befindliche Nikotinmenge konnten jedoch nicht gemacht werden, da dem Verfasser noch keine exakte s p e z i f i s c h e quantitative Methode zur Verfügung stand. Deshalb stellten wir uns die Aufgabe, eine Grundlage für ein derartiges Nachweisverfahren zu schaffen.

Versuche mit demselben Ziel unternahmen schon vor uns WOLFF, HAWKINS und GILES (4,5,6). Sie destillierten Raucherblut nach Ausfällung der Plasmaproteine mit Trichloressigsäure in alkalischem Medium mit Wasserdampf und versetzten das Destillat mit Cyanbromid- $\beta$ -naphthylamin. Die entstandene Farbe wurde anschließend spektralphotometrisch ausgewertet. Sie erhielten aus Blutproben von 10 ml Raucherblut nach dem Genuß von ca. 20 Zigaretten in 8 Stunden Nikotinausbeuten von  $0,09/\mu\text{g}$  bis  $0,62/\mu\text{g}$  pro Milliliter Blut im Durchschnitt und als Höchstbetrag (Einzelfall)  $1,3/\mu\text{g/ml}$  Blut. Die kolorimetrische Methode mit Bromcyan ist jedoch nicht nikotinspezifisch, da sie bei allen Pyridinbasen positiv ausfällt.

Das gleiche gilt auch für die Polarographie (7), ein elektrochemisches Nachweisverfahren nach HEYROVSKY (8,9). Jedoch läßt sich dieses Verfahren, das außerdem eine relativ hohe Empfindlichkeit besitzt, für eine spätere Nikotinbestimmung im Blut spezifisch gestalten, wenn man vorher das Alkaloid dem Blut entzieht und von Ballaststoffen reinigt. Daher un-

tersuchten wir, welche aus der Vielzahl bekannter einfacher chemischer Trennmethoden, wie z.B. Ausschütteln mit Lösungsmitteln, Papierchromatographie, Dialyse usw., am geeignetsten sind, das Nikotin von anderen im Blut vorkommenden, den polarographischen Nachweis eventuell störenden Substanzen abzutrennen. Weiterhin beabsichtigten wir, durch polarographische Messungen wäßriger Nikotinlösungen eine Grundlage für eine spätere quantitative polarographische Nikotinbestimmung in Raucherblutextrakten zu schaffen.

Versuche, reines Nikotin polarographisch zu erfassen, wurden schon von KIRKPATRICK (10) 1946 und VOLKE/VOLKOVA (11) 1954 unternommen. Sie schlossen aus dem Oscillogramm des Nikotins beim Polarographieren in saurer, neutraler und alkalischer Lösung, daß der Pyridinkern einer polarographischen Reduktion unterliegt. Schon 1932 zeigte SEMERANO (12), von neutralisierten Tabakextrakten ausgehend, daß das Nikotin eine kathodische Welle im sauren Milieu lieferte. RUSCONI, MONNIER und WENGER (13) verbesserten seine Technik im Jahre 1951.

Außerdem wurde das Nikotin auch indirekt durch amperometrische Titration mit Silikowolframsäure von WILLITS/RICCIUTI (14) und von DE ANGELIS (15) bestimmt. HASSELBACH (16) polarographierte Nikotin direkt in Tabakextrakten nach vorheriger Wasserdampfdestillation. MELAMED, NANGNIOT und MARTENS (17) untersuchten reines Nikotin ebenfalls polarographisch in verschiedenen Pufferlösungen.

Alle hier genannten Autoren führten die polarographischen Nikotinbestimmungen hauptsächlich in Tabakextrakten durch, deren Nikotinkonzentrationen wesentlich höher und damit leichter meßbar waren als die einer Blutprobe von 10 ml. Polarographische Messungen von Nikotin im Blut liegen bisher noch nicht vor.

## B. Versuche zum qualitativen Nikotinnachweis in wässrigen Lösungen und im Harn

### I. Erprobung von Farbreagenzien auf Papierchromatogrammen

In einleitenden Versuchen prüften wir einige für den Alkaloidnachweis auf Papierchromatogrammen allgemein angewandte Farbreagenzien auf ihre Empfindlichkeit für den Nikotinnachweis. Hierzu wurden wechselnde Nikotinmengen (100; 50; 10; 5; 1; 0,8; 0,5; 0,3; 0,2 und 0,1  $\mu\text{g}$ ) auf Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll, 2043 b) aufgetragen und nach dem Trocknen mit folgenden Reagenzien angefärbt:

1. Reagens nach MUNIER/MACHEBOEUF (18)  
(Besprühen mit Kaliumjodid-Wismutnitrat)
2. Reagens nach KÖNIG (19,20)  
(Besprühen mit 2%-iger wässriger o-Phenylendiaminlösung und anschließendes Einhängen in Bromcyan-Atmosphäre)
3. Jodreagens (21)  
(Einwirken von Joddämpfen)
4. Oxydationsprobe mit Kaliumpermanganat (22)  
(Besprühen mit 1%-igem Kaliumpermanganat und 10%-igem Natriumkarbonat (1:1) )

Ergebnis: Von den vier untersuchten Reagenzien war das von MUNIER/MACHEBOEUF am brauchbarsten, da es als einziges so empfindlich war, daß noch ein Nikotinfleck von 0,3  $\mu\text{g}$  deutlich sichtbar gemacht werden konnte (ziegelroter Fleck auf gelbem Hintergrund).

### II. Papierchromatographischer Nachweis von Nikotin in Harnextrakten

Zunächst befaßten wir uns mit Versuchen zur Abtrennung des Nikotins aus Harn. Dieses Substrat erschien uns als Modell für spätere Blutuntersuchungen besonders geeignet, da Harn weniger großmolekulare Anteile als Blut enthält. Um eine Extraktion des Nikotins aus Harn zu erproben, versetzten wir jeweils 30 ml Harn mit 50  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{g}$  und 1 mg Nikotin, das wir dann nach der von JATZKEWITZ (23) beschriebenen Methode wieder aus dem Harn isolierten: Der mit Ammoniak alkalisch gemachte Harn wurde mit Äthylacetat <sup>x)</sup> wiederholt ausgeschüttelt (je-

---

x) Essigsäureäthylester MERCK "reinst"

weils zweimal mit je 10 ml), daraus das Nikotin mit je drei Tropfen 15%-iger Ameisensäure reextrahiert und auf Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll, 2043 b) aufgetragen. Es wurde aufsteigend (16 Stunden) chromatographiert. Außerdem liefen bei jedem Versuch Nikotin-Testflecke der gleichen Konzentration mit.

#### Laufmittel:

1. n-Butanol : 15%-iger Ameisensäure : Wasser = 12 : 1 : 7  
Rf-Wert: 0,23  
(nach JATZKEWITZ, 23)
2. Dichloräthan : Eisessig : Wasser = 10 : 4 : 1  
Rf-Wert: 0,23 - 0,27  
(nach VIDIC, 24)

Ergebnis: Nach dem Besprühen der Papierchromatogramme mit Kaliumjodid-Wismutnitrat zeigten die entwickelten, den Harnextrakten entsprechenden Nikotin-Farbflecke ähnliche Farbintensität wie die mitgelaufenen Nikotin-Testflecke. Das bedeutet, daß Nikotinkonzentrationen von 50 µg pro 30 ml Harn nach Ausschütteln des Harns und Papierchromatographie noch nachweisbar sind. Dabei blieb es vorerst offen, wo die untere Nachweisgrenze des Nikotins liegt.

Unabhängig von der Wahl des Laufmittels erzielten wir das gleiche Resultat.

### III. Papierchromatographie auf gepufferten Papieren

Zur Reextraktion von Nikotin aus Harnextrakten - und später auch aus Blutextrakten - verwandten wir anstelle der von JATZKEWITZ (23) vorgeschlagenen Ameisensäure in allen weiteren Versuchen S a l z s ä u r e , da sich hierdurch nach VIDIC (24) mehr Nikotin zurückgewinnen läßt. Daraus ergab sich jedoch, daß die zur Reextraktion des Nikotins verbrauchte und auf die Chromatographiepapiere aufgetragene Salzsäure zu starken Schwankungen der Rf-Werte führte, was hauptsächlich in einer langsameren Wanderungsgeschwindigkeit der Nikotin-Chlorhydrat-Flecke zum Ausdruck kam. Da die hierdurch bedingte ungenügende papierchromatographi-

sche Vortrennung des Nikotins von anderen störenden Substanzen eine spätere quantitative Auswertung der Chromatogramme sehr erschweren würde, versuchten wir, durch Verwendung gepufferter Papiere nach dem Verfahren von KRAFT (25) die  $R_f$ -Werte zu stabilisieren:

Hierzu fertigten wir uns durch Tränken mit Phosphatpuffern von pH 5-9 imprägnierte Papiere und entwickelten mit wassergesättigtem Butanol.

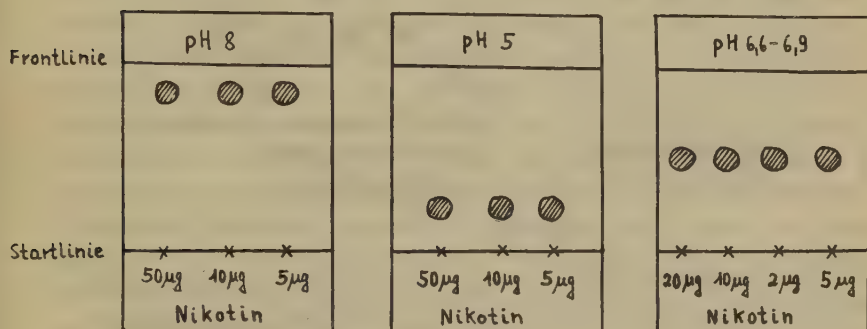


Abb. 1

Die Abb. 1 zeigt deutlich die starke Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit des Nikotins vom pH-Wert der zur Imprägnation der Papiere verwendeten Puffer. Nach diesen Versuchen erschien uns ein Chromatographiepapier, das mit m/15 SÖRENSEN-Phosphatpuffer (26) von pH 7 vorbehandelt war, als besonders geeignet. Den Gegenbeweis lieferten Versuche, bei denen auf ein und demselben Startfleck mit Nikotin gleichzeitig etwas Säure (siehe Anmerkung zu Abb. 2) aufgetragen wurde. Wie das in Abb. 2 auf Seite 6 mit pH 7 gekennzeichnete Chromatogramm zeigt, ließen sich die  $R_f$ -Werte erst dann stabilisieren, wenn die aufgetragene Salzsäure durch Ammoniak neutralisiert wurde. Um eine genaue Neutralisation zu erreichen, ersetzten wir in allen weiteren Versuchen das Auftropfen von Ammoniak durch Einhängen der fertigen Papierchromatogramme in Ammoniakatmosphäre.

So konnte durch Verwendung pH 7 gepufferter Papiere und durch Neutralisation der zusammen mit Nikotin auf das Chromatogra-

phiepapier aufgetragenen Salzsäure eine Stabilisierung der Rf-Werte erreicht werden. Um kleine, vom Laufmittel ausgehende Schwankungen des Rf-Werts zu erkennen, ließen wir bei jedem Versuch Nikotin-chlorhydrat (mit Salzsäure-Überschuß) als Testflecken mitlaufen.

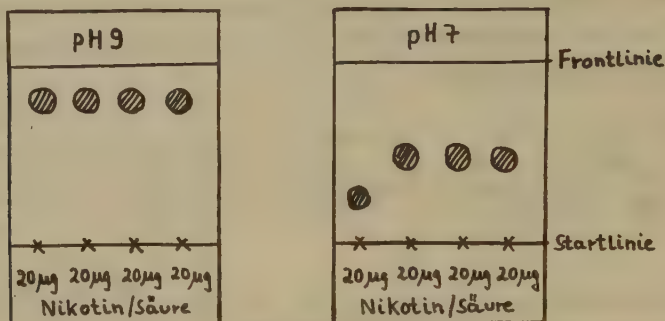


Abb. 2

(Auf die Chromatogramme der Abb. 1 wurden reine wäßrige Nikotinlösungen und auf die der Abb. 2 wäßrige Nikotinlösungen mit etwas Säure aufgetragen:

Von links nach rechts: 20 µg Nikotin in 0,24 ml 0,1 n Salzsäure; 20 µg Nikotin in 0,24 ml 0,1 n Salzsäure + 1 Tropfen Ammoniak (25%-ig); 20 µg Nikotin in 0,24 ml Ameisensäure (15%-ig); 20 µg Nikotin wäßriger Lösung.)

# C. Versuche zur Abtrennung des Nikotins aus mit Nikotin versetzten Blutproben

## I. Vorversuche zur Trennung des Alkaloids von Ballaststoffen

Anschließend gingen wir zu Versuchen mit Blut über, das wir mit sterilen Ventülen (Behringwerke/Marburg-Lahn) abnahmen. Wir versetzten jeweils 10 ml Nichtraucherblut, das durch Zugabe von Natriumfluorid (10 mg/ml) ungerinnbar gemacht worden war, mit zunächst 250 und 500 µg Nikotin. Danach wurde das Blut mit Perchlorsäure (75%-ig) enteiweißt, die überstehende Flüssigkeit mit 15%-iger Kalilauge alkalisch gemacht (pH 8/9), mit Äthylacetat ausgeschüttelt, anschließend mit 0,1 n Salzsäure reextrahiert (siehe Seite 3 u. 4) und dann - wie oben beschrieben - papierchromatographiert.

Nikotinmengen von  $250 \mu\text{g}/10 \text{ ml}$  Blut waren durch die Farb-reaktion auf den Papierchromatogrammen eben noch nachweisbar. Weil mit wesentlich geringeren Konzentrationen im Raucherblut zu rechnen war, wurde von weiteren Versuchen dieser Art abgesehen. Gleichzeitig stellten wir fest, daß auch nach Zusatz von 3 g Natriumchlorid zum Blut (Aussalzeffekt) die Farbintensität auf den Papierchromatogrammen der Blutextrakte nicht merkbar zunahm.

Weitere Versuche, das Nikotin des Blutes ( $500 \mu\text{g}/10 \text{ ml}$  Blut) durch vorherige Zugabe von Salzsäure oder Natronlauge und anschließendes vorsichtiges Erwärmen im Wasserbad (Aufschluß: 2 Min.  $90^\circ$ ) leichter extrahierbar zu machen, indem man seine Bindefähigkeit an die Plasmaproteine herabsetzt, waren unbrauchbar, da aus saurem Medium Nikotin überhaupt nicht zu extrahieren ist; aber auch nach Abstumpfen der Säure bis auf pH 7-8 waren keine im Papierchromatogramm faßbaren Nikotinmengen zu gewinnen. Aus mit Natronlauge alkalisch gemachtem Blut war das Nikotin ( $500, 100, 20 \mu\text{g}/10 \text{ ml}$  Blut) nach vorheriger Extraktion mit Essigsäureäthylester auf den Papierchromatogrammen noch bis zu Konzentrationen von  $20 \mu\text{g}/10 \text{ ml}$  Blut (!) nachweisbar, jedoch von recht vielen Störsubstanzen begleitet, die zu Verschiebungen der Rf-Werte und zum Schwänzen (tailing) der gewonnenen Nikotinflecke führten.

Die Extraktion des Nikotins ließ sich unter Anwendung eines Perforators verbessern, d.h. Nikotinflecke, die Konzentrationen von 100, 200 und  $500 \mu\text{g}$  Nikotin pro 10 ml Blut entsprachen, ließen sich auf den Papierchromatogrammen intensiver anfärben als solche gleicher Konzentrationen nach einfacher Extraktion durch Schütteln im Scheidetrichter. Zur Perforation wurde das alkalisch gemachte (pH 12) nikotinhal- tige Blut mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 2,5 verdünnt und dann 2 Stunden lang mit Äthylacetat perforiert. Im Auffangkolben (siehe Abb. 3 auf Seite 9) sammelte sich das in Äthylacetat gelöste Nikotin an. Dieses wurde anschlie- ßend mit etwa 0,1 ml 0,1 n Salzsäure im Zentrifugenspitzen- glas ausgeschüttelt. Die nach dem Zentrifugieren in der Spitze abgesetzte Nikotinchlorhydrat-Lösung wurde dann auf das Pa- pierchromatogramm aufgetragen und in Butanol-Ameisensäure-

Wasser entwickelt. Wenn sich auch hierdurch bei den angewandten Konzentrationen auf den Papierchromatogrammen nach Besprühen mit Kaliumjodid-Wismutnitrat starke Rotfärbungen der Nikotin-Flecke erzielen ließen, so war doch der Nikotinverlust bei wiederholten Versuchen noch relativ hoch, da die Fritte des Perforators trotz stärkerer Blutverdünnungen (Verhältnis 1 : 5 und mehr) durch Koagulation des Eiweißes verstopfte. Daher suchten wir einen Ausweg, dies zu verhindern.

## II. Dialyse von Blutproben, Anreicherung des Nikotins durch Perforation der Dialysate und papierchromatographische Auswertung der Perforate

Ein in der Biochemie häufig benutztes Verfahren, kleinmolekulare Substanzen - wie hier das Nikotin - von störenden großmolekularen - wie hier die Plasmaproteine - zu trennen, ist die Dialyse. Da wir vorerst nicht wußten, ob das Nikotin als freie Base oder als salzsaures Salz - beide sind gut wasserlöslich - besser dialysierbar ist, haben wir in getrennten Ansätzen jeweils 10 ml Blut (10 mg Natriumfluorid/ml) mit zugesetztem Nikotin (1 mg, 500, 100 und 10  $\mu$ g) gegen 45 ml 0,01 n Salzsäure und gegen 45 ml 2%-iges Natriumkarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ ) 24 Stunden <sup>x)</sup> lang dialysiert. Anschließend trennten wir das Nikotin aus dem Dialysat durch Perforation mit Äthylacetat ab und reextrahierten es mit Salzsäure aus dem Perforat. (Methode der Perforation auf Seite 9). Die papierchromatographische Auswertung der Perforate führte zu folgenden Ergebnissen: <sup>xx)</sup>

1. 1 mg (!) zugesetztes Nikotin konnte nach saurer Dialyse des Blutes nicht mehr wiedergefunden werden. Dabei muß die Frage, in welcher Form das Nikotin sich dem Nachweis entzieht, unbeantwortet bleiben.
2. Aus soda-alkalischen Dialysaten ließen sich auf Papierchromatogrammen nach dem Besprühen mit Kaliumjodid-Wismutnitrat deutlich alle Nikotin-Farbflecke, selbst noch die von 10  $\mu$ g pro 10 ml Blut, sichtbar machen.

---

x) In einigen Fällen wurde nur 18 Std. dialysiert..

xx) Auf die genaue Wiedergabe der Versuchsanordnung wurde hier verzichtet, da sie im folgenden Kapitel (C.III.) an Hand eines Versuchsbeispiels eingehend beschrieben wird.

Methode der Perforation: Bei A verdampft Äthylacetat und steigt im Perforator bis B hoch, kondensiert sich dort und

tropft bei C in eine Glasröhre, aus der es von unten durch die spezifisch schwerere Schicht des Dialysates als leichtere Flüssigkeit hochperlt und auf diesem Wege Nikotin auswäscht. Bei D läuft das nikotinhaltige Äthylacetat wieder in den Auffangkolben zurück und verdampft aufs Neue. Dabei bleibt das Nikotin zurück, da es nicht so leicht verdampft wie das organische Lösungsmittel.

Nach 2 Stunden ist das gesamte Nikotin aus dem Dialysat ausgewaschen.

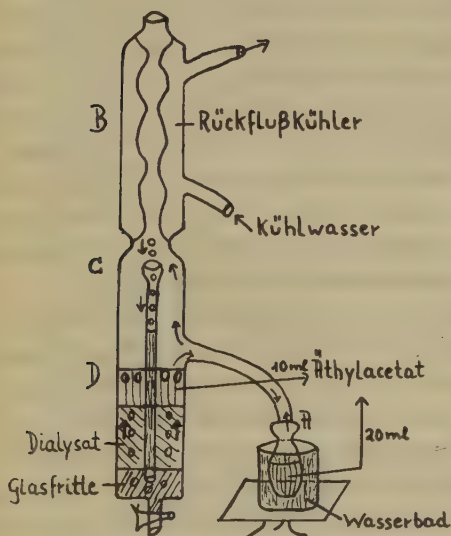


Abb. 3  
Perforator

### III. Versuchsbeispiel zum qualitativen Nikotinnachweis im Raucherblut und Messung des UV-Spektrums

Um kleine Nikotinmengen aus einer Blutprobe zu isolieren und gleichzeitig von störenden Begleitsubstanzen abzutrennen, könnte man auf Grund unserer Versuche folgenden Aufarbeitungsgang für den qualitativen Nikotinnachweis vorschlagen:

1. Soda-alkalische Dialyse der Blutprobe
2. Perforation des Dialysates mit Essigsäureaethylester
3. Reextraktion des Perforates mit 0,1 n Salzsäure
4. Papierchromatographie auf gepufferten Papieren
5. Farbreaktion (Reagens nach MUNIER/MACHEBOEUF, 18)

Um die Brauchbarkeit dieses vorgeschlagenen Aufarbeitungsganges zu erproben, stellten wir mehrere Versuche mit Raucherblut an, wovon einer als Versuchsbeispiel im folgenden wiedergegeben ist:

### Versuchsbeispiel

1. Soda-alkalische Dialyse der Blutprobe: 10 ml Raucherblut wurden mit 2 ml 20%-igem Natriumkarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ , MERCK) alkalisch gemacht, leicht geschüttelt und in einem 2,5 cm breiten Cellophan-schlauch (KALLE) gegen 45 ml 2%-iges Natriumkarbonat in einem Becherglas 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur dialysiert, wobei der Dialysierschlauch mittels Elektromotor in der Flüssigkeit gedreht wurde.

2. Perforation des Dialysates mit Essigsäureaethylester: Das Dialysat (ca. 42 ml) wurde mit 10 ml Essigsäureaethylester (MERCK) in einen etwa 55 ml fassenden Perforator (s. Abb.3, S.9) gegeben, dann der Auffangkolben mit 20 ml Essigsäureaethylester beschickt und im Wasserbad erhitzt. Nach Auftreten der ersten durch das Dialysat aufsteigenden Essigsäureaethylester-Perlen perforierten wir 2 Stunden lang.

3. Reextraktion des Perforates mit 0,1 n Salzsäure: Das Perforat (= Essigsäureaethylester im Auffangkolben) verteilten wir nach Abkühlung auf zwei Zentrifugenspitzgläser und schüttelten jedes dreimal mit je 0,1 ml 0,1 n Salzsäure (MERCK). Nach jedem Ausschütteln mit 0,1 ml Salzsäure wurde zentrifugiert und die sich in der Spitze abgesetzte Säure mit einer Kapillare auf einen und denselben Fleck im Papierchromatogramm aufgetragen. Von den insgesamt hinzugegebenen 0,6 ml Salzsäure gingen ca. 0,36 ml in Lösung, so daß bei diesem Versuch schließlich nur 0,24 ml Nikotinchlorhydrat auf das Papierchromatogramm gelangten.<sup>x)</sup> Der relativ hohe Verlust an Salzsäure mag auf die Alkalität des Perforationsgutes (Dialysat) zurückzuführen sein. Obwohl das Lösungsmittel im Laufe des Perforierens an wässriger Phase gesättigt sein müßte, läßt sich ein Teil der zur Extraktion verwandten Salzsäure nicht zurückgewinnen (Emulsionsbildung?). Trotzdem ist es möglich, durch mehrmalige Extraktion mit Salzsäure eine für qualitative Analysen (Papierchromatographie u. UV-Spektrum) ausreichende Menge Nikotin zurückzugewinnen.

4. Papierchromatographie auf gepufferten Papieren: 15 cm breite und 50 cm lange Papierstreifen (Schleicher & Schüll, 2043 b) wurden durch SÖRENSEN-Phosphatpuffer (26) von pH 7 gezogen, zwischen Filterpapieren ausgedrückt und dann bei Zimmertemperatur getrocknet. Anschließend zeichneten wir 7 cm vom unteren Papierrand entfernt die Startlinie ein und kennzeichneten mit Kreuzen (mit Bleistift!) die Ausgangspunkte der aufzutragenden Substanzen. Neben der Analysensubstanz lief Nikotinchlorhydrat als Testfleck mit.

Hierfür wurden 0,1 ml einer Nikotinlösung<sup>xx)</sup> ( = 100  $\mu\text{g}$  ) auf

x) Nicht immer waren die Salzsäure-Verluste so hoch wie bei diesem Versuch (s.S. 7 unten).

xx) Zur Herstellung der Nikotinlösung verwandten wir Nikotin reinst (Schuchardt).

einen zweiten Startpunkt aufgetragen und nach dem Trocknen noch 0,24 ml 0,1 n Salzsäure tropfenweise auf demselben Fleck eingedampft. Das Trocknen der einzelnen Tropfen wurde durch kalte Ventilatorluft beschleunigt. Schließlich hängten wir das Papierchromatogramm für 10 Minuten in Ammoniakatmosphäre (hierfür stellten wir in einen Glaszylinder ein kleines Gläschen mit 25%-igem Ammoniak) zur Neutralisation der Salzsäure, ließen dann den Papierstreifen 1/2 Stunde abdampfen und brachten ihn schließlich in einen Glaszylinder mit etwa 200 ml wassergesättigtem Butanol, in das der untere Papierrand etwa 1 cm eingetaucht wurde. Die Laufzeit betrug 16 Stunden.

5. Farbreaktion (Reagens nach MUNIER/MACHEBOEUF): Nachdem das Papierchromatogramm über nacht aufsteigend gelaufen war, ließen wir es nach Markierung der Laufmittelfront trocknen und besprühten es dann mit dem frisch bereiteten Reagens nach MUNIER/MACHEBOEUF x).

Ergebnis: Auf zitronengelbem Hintergrund färbte sich in gleicher Höhe mit dem Nikotin-Testfleck bei einem Rf-Wert von 0,6 der dem Raucherblutextrakt entsprechende Nikotinfleck sehr stark ziegelrot an.

Aufnahme des UV-Spektrums: Um zu klären, ob diese aus dem Raucherblut extrahierte Substanz tatsächlich Nikotin war, prüften wir sie auf ihr Absorptionsverhalten im UV-Licht. Hierzu wurden folgende drei Papierstückchen (bei gleichem Rf-Wert !) aus dem Papierchromatogramm ausgeschnitten und mit je 4 ml 0,1 n Schwefelsäure extrahiert:

1. Farbfleck der 100 µg Nikotin-Testlösung
2. Raucherblutextrakt-Farbfleck
3. Papierleerwert-Fleck (der entsprechenden Größe)

Die Eluate wurden 1:2 mit Schwefelsäure verdünnt.

Die beiden erstgenannten Extrakte wurden gegen die Bezugslö-

---

x) Sprühreagens nach MUNIER/MACHEBOEUF

Lösung A: 850 mg Wismutsubnitrat in 10 ml Eisessig und  
40 ml Wasser

Lösung B: 8 g Kaliumjodid in 20 ml Wasser

A + B ergeben die Stammlösung, die in brauner Flasche unbegrenzt haltbar ist. Vor dem Besprühen mischt man 1 ml Stammlösung mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser.

sung des Papierleerwertes im sauren Bereich (230-290 m $\mu$ ) gemessen.

Ergebnis: Die beiden erzielten Kurven (siehe Abb. 4) zeigten Übereinstimmung in ihren Maxima. Aus dem Vergleich beider Kurven ergab sich mit hoher Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei der eluierten Substanz tatsächlich um Nikotin handelte.

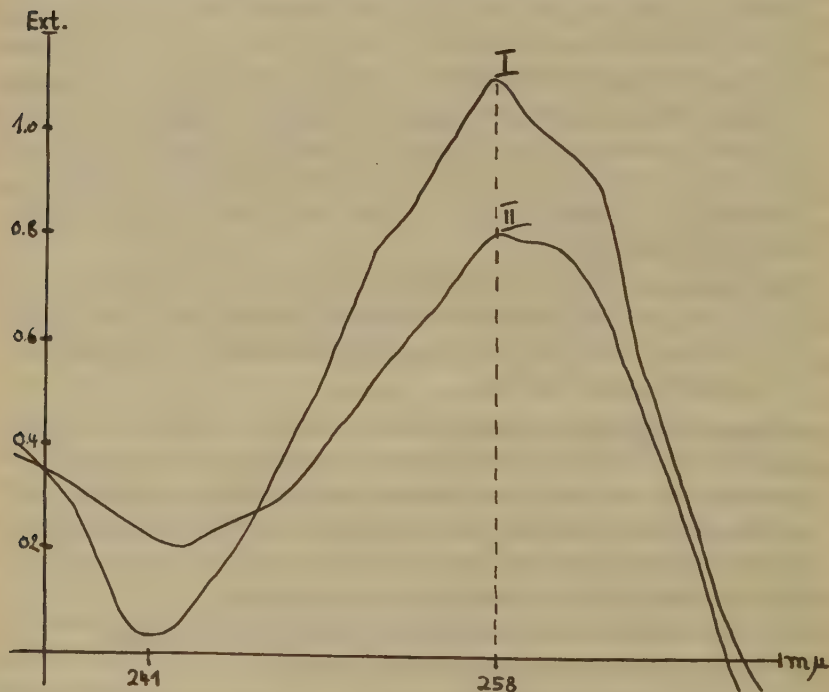


Abb. 4

I = 100  $\mu$ g Nikotin-Testlösung

II = Raucherblutextrakt

(Blutprobe eines starken Rauchers,  
50 Zigaretten/Tag)

Die Kurven wurden mit dem Spektralphotometer Beckmann DK 2 aufgenommen. (Schichtdicke 10 mm, Quarzküvette)

D. Versuche zum polarographischen quantitativen Nikotinnachweis in wäßrigen Lösungen

Da beabsichtigt ist, im Laufe späterer Untersuchungen das auf den Papierchromatogrammen aus Raucherblut qualitativ nachgewiesene Nikotin auch quantitativ zu erfassen und weiterhin daran gedacht ist, hierzu die Polarographie einzusetzen, soll im folgenden über Versuche berichtet werden, die das Ziel hatten, folgende Fragen zu klären:

1. Welche Bedingungen sind die günstigsten für den polarographischen quantitativen Nikotinnachweis in wäßrigen Lösungen ?
2. Wirken sich Eluate aus Papierchromatogrammen störend auf den polarographischen Nikotinnachweis aus ?
3. Wie groß ist die Empfindlichkeit des polarographischen Nikotinnachweises, und mit welcher Fehlerbreite ist zu rechnen ?

I. Versuche zur Methodik der Polarographie und Anfertigung von Eichkurven

Die Polarographie nach HEYROVSKY (8,9) ist eine elektrochemische Methode, bei der man mit Hilfe einer Quecksilbertropf-elektrode, an die eine kontinuierlich wachsende Spannung angelegt wird, Strom durch eine Analysenlösung leitet, wodurch eine Elektrolyse stattfindet. In Gegenwart von Substanzen, die der Elektrolyse unterliegen, sogenannten Depolarisatoren, wächst der Strom bei einer bestimmten Spannung, die die Qualität des Depolarisators charakterisiert, sprunghaft an. Hierbei ist der Stromanstieg der Konzentration des Depolarisators proportional. Die hieraus resultierende Strom-Spannungskurve gibt also Auskunft sowohl über die Qualität als auch über die Quantität der in der Elektrolysenlösung vorhandenen Substanzen. Die elektrolytische Reduktion wird durch eine geeignete gut stromleitende Pufferlösung katalysiert. Die Tropfener-schütterung der Strom-Spannungskurve kann im Polarographen

durch Dämpfung, d.h. durch einen entgegengesetzt wirkenden Strom, verkleinert werden.

Für unsere polarographischen Nikotinmessungen <sup>x)</sup> wählten wir als Grundelektrolyt (= stromleitende Pufferlösung) eine mit 2,5%-igem Ammoniak auf pH 7,5 eingestellte 0,1 molare Ammoniumchlorid-Lösung, deren Strom-Spannungskurve (siehe Figur 1) <sup>xx)</sup> sich deutlich von der des Nikotins in der Pufferlösung unterscheidet.

Die Kurven wurden bei folgender Einstellung des Polarographen aufgenommen:

Empfindlichkeit: 10  $\mu$ A

Gesamtspannung : - 2,0 V (= Skalaeinteilung: 1-100 Teilstriche)

Papiervorschub : 1200 mm/h

Quecksilbertropfelektrode: a) Höhe: 61 cm

b) Tropfenfolge: 5 sec.

Temperatur: 20 Grad

Die Messungen erfolgten ab - 1,0 Volt.

In Figur 1 wird eine Ammoniumchloridkurve als Kurven-Leerwert gezeigt. Der anfängliche Kurvenanstieg ist durch Spannungsänderung von - 0,1 V auf - 1,0 V bedingt. Danach verläuft die Kurve relativ parallel zur Null-Linie ungestört bis zu - 1,88 V und steigt erst dann bis zur Endspannung von - 2,0 V wieder an. Aus Figur 1 ist weiterhin ersichtlich, wie die Ammoniumchloridkurve nach Zugabe von Nikotin (10  $\mu$ g/ml Puffer) verändert wird. Die Nikotinwelle steigt bei - 1,66 V an. Ihr Wendepunkt liegt bei - 1,78 V (= Halbstufenpotential =  $E_{1/2}$ , (7) ), und ihr Maximum (= Ende der Nikotinwelle) ist bei - 1,86 V erreicht. Letzteres schwankte in über 1200 gemessenen Kurven von - 1,84 bis - 1,88 V. Der Anstieg der Nikotinwelle (- 1,66 V) entspricht dem Tangentenpotential, das ist das Potential des Stufenbeginns, bei dem der Winkel einer angelegten Tangente 45 Grad beträgt. Es ist konstant bei

---

x) Die Messungen wurden mit dem Polarographen von Dr. A. Kuntze/Düsseldorf durchgeführt.

xx) Die Kurven Figur 1-5 sind im Anhang ab Seite 29 wiedergegeben.

gleichbleibendem pH-Wert des Grundelektrolyten. KIRKPATRICK (27) gibt als Tangentenpotential - 1,72 V für Nikotin in einem Phosphatpuffer von pH 6,0 und für einen Boratpuffer von pH 8,0 den Wert von - 1,68 V an. (Das Tangentenpotential unserer Nikotinstufen beträgt - 1,66 V für den Ammoniumchloridpuffer von pH 7,5.) Auch das Halbstufenpotential ist für die einzelne Analysensubstanz konstant und ändert sich nur dann, wenn große Konzentrationsunterschiede gemessen werden. Zur Ermittlung der Stufenhöhe fällt man das Lot vom Wendepunkt der Nikotin-Endstufe (= Maximum) auf die an den Stufenbeginn angelegte Tangente. Es ergibt sich dann z.B. für die Kurve in Figur 1 eine Stufenhöhe von 0,85 cm.

Zum besseren Verständnis der beiden beschriebenen Kurven der Figur 1 ist noch Grundsätzliches zu bemerken: Es ist bekannt, daß zahlreiche Alkaloide auf die Wasserstoffabscheidung katalytisch wirken (BREZINA/ZUMAN, 28). Auch Nikotin verursacht katalytische Wellen, was sowohl KIRKPATRICK (10,27) als auch JINDRA, JUNGER und ZYKA (29) beschrieben haben. Letztere geben als Optimum für die quantitative Bestimmung bei Nikotinkonzentrationen von 0,00005 - 0,0005 mol/l einen pH-Wert von 8,0 an. Im Falle der Nikotinwirkung handelt es sich also nicht um die Nikotinwelle selbst sondern um die durch das Nikotin bewirkte katalytische Wasserstoffwelle. Somit ist die polarographische Nikotinbestimmung eine indirekte, aber eine durchaus brauchbare, da es sich letzten Endes um die durch Nikotin veränderte Pufferkurve handelt, was die beiden Kurven der Figur 1 beweisen.

Weiterhin ist zu beachten, daß in wäßriger Lösung vorliegende Sauerstoffspuren durch Überlagerung der interessierenden Reduktionsstufen eine empfindliche Störung verursachen können. So bewährte es sich (KAHLE/REIF, 30), vor der polarographischen Messung die Lösung durch eine Kapillare (um die Stickstoffblasen klein zu halten und die Analysenlösung nicht zu zerstäuben) mit Reinststickstoff (KNAPSACK AG., Duisburg) zu begasen. Die Dauer der Begasung ist abhängig von dem Durchmesser der Kapillare, dem Stickstoffdruck und

der dadurch erzielten Größe der einzelnen Stickstoffblasen. Eine ausreichende Entlüftung ist erreicht, wenn das Kurvenbild durch weitere Gaszufuhr nicht mehr verändert wird. In unseren Versuchen waren hierfür zwei Minuten ausreichend. Aus Figur 2 ist ersichtlich, daß eine reine Pufferkurve nach Begasung wesentlich flacher verläuft.

Um mit möglichst kleinen Mengen an Analysensubstanz für die Messungen auszukommen, arbeiteten wir nach der Uhrglasmethode (BREZINA/ZUMAN, 31), die es gestattet, die Messung mit nur einem Tropfen Analysenlösung zwischen Quecksilbertropfelektrode und Bezugselektrode auszuführen. Es hat den Vorteil, mit verschiedenen Tropfen mehrere Kurven derselben Analysenlösung schreiben zu können, deren Mittelwert genauer ist als das Ergebnis einer einmaligen Messung. Ein mehrmaliges Aufzeichnen der Kurve mit demselben Tropfen ist nicht möglich, da durch den Stromdurchgang die Lösung elektrolytisch zersetzt wird. Ein vereinfachtes Bild des Quecksilbertropfelektroden-Stativs gibt die Abbildung 5 auf Seite 17 wieder. Dazu ist zu bemerken, daß der Quecksilberspiegel im Sammelgefäß stets die gleiche Höhe haben muß, wenn Kurven miteinander verglichen werden sollen, was besonders wichtig ist, wenn man sich nach Eichkurven richtet.

#### Anfertigung von Eichkurven:

Die Messungen erfolgten in einer 0,1 molaren Ammoniumchloridlösung (pH 7,5), der wechselnde Mengen Nikotin in steigender Konzentration (1 - 8  $\mu\text{g/ml}$  Pufferlösung) zugesetzt wurden. Die Kurven nahmen wir bei drei verschiedenen Empfindlichkeiten auf (4, 6 und 10  $\mu\text{A}$ ). Mit den Ergebnissen dieser drei Versuchsreihen wurde jeweils eine Fehlerberechnung aufgestellt, woraus sich folgende Werte ergaben:

| Empfindlichkeit  | mittlere Abweichung | Standardfehler des Mittelwertes |
|------------------|---------------------|---------------------------------|
| 4 $\mu\text{A}$  | 1,59 cm             | 6,5 mm                          |
| 6 $\mu\text{A}$  | 1,2 cm              | 4,9 mm                          |
| 10 $\mu\text{A}$ | 0,7 cm              | 2,9 mm                          |

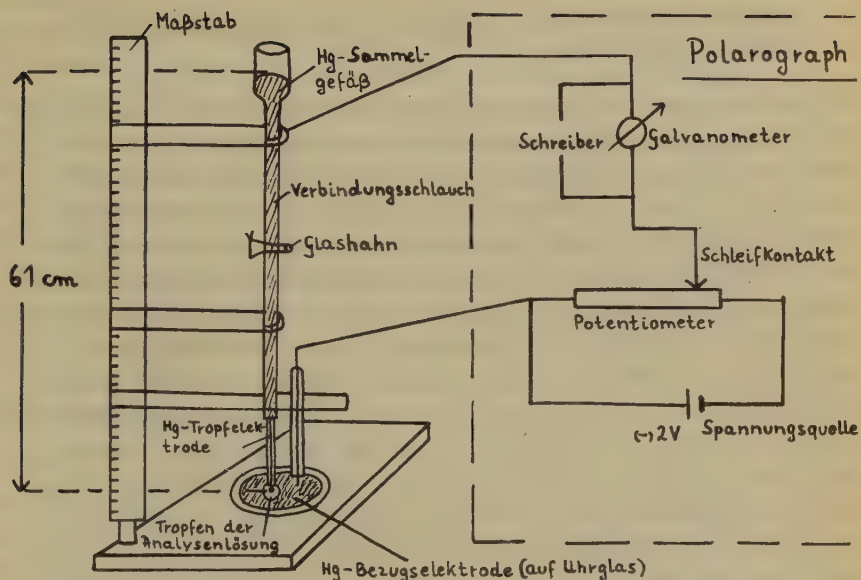


Abb. 5

### Quecksilbertropfelektroden-Stativ

Nach dieser Berechnung zeigten die Meßergebnisse bei der Empfindlichkeit von  $10 \mu\text{A}$  für den angewandten Konzentrationsbereich eine relativ kleine Streuung, weshalb wir alle folgenden polarographischen Messungen bei dieser Empfindlichkeit durchführten. Die Kurven der Meßreihe bei der Empfindlichkeit von  $10 \mu\text{A}$  sind in Figur 3 dargestellt. Die hierfür aufgestellte Fehlerberechnung sowie die daraus ermittelte graphische Darstellung der Eichgeraden sind im Anhang auf Seite 34ff. wiedergegeben. Die errechnete Irrtumswahrscheinlichkeit liegt danach unter 1%.

Ergebnis: Die Nikotinmessungen erfolgten in 0,1 molarer Ammoniumchloridlösung (pH 7,5) als Grundelektrolyt. Das Tangentenpotential der Nikotinstufen liegt bei  $-1,66 \text{ V}$ , das Halbstufenpotential bei  $-1,78 \text{ V}$  und das Endstufenpotential (= Maximum) bei  $-1,84$  bis  $-1,88 \text{ V}$ . Die Kurven sind reproduzierbar. Mit Nikotinlösungen steigender Konzentration ließ sich eine Eichgerade ermitteln.

## II. Elutionsversuche an Papierchromatogrammen und Anfertigung von Eichkurven

Wir gingen zunächst von Papierchromatogrammen aus, auf die das Nikotin in Form des Chlorhydrates aufgetragen und danach zur Neutralisation des Säure-Überschusses Ammoniak aufgetropft wurde (siehe S. 5/6). Nach der  $R_f$ -Wert-Bestimmung des Nikotin-Testfleckes schnitten wir in gleicher Höhe und Größe die den Analysenlösungen entsprechenden, nicht besprühten Papierflecke aus und eluierten sie mit 0,1 molarem Ammoniumchlorid. Wir benutzten zuerst die von SANGER und TUPPY (32) beschriebene Kapillarelation. Hierbei traten nach der Elution bei der polarographischen Messung beträchtliche Störungen auf. Auch nach dem Messen des Papierleerwertes (der in gleicher Weise mit Salzsäure und Ammoniak versehen war) waren die Kurven nikotinähnlich, d.h. sie stiegen im Bereich der Nikotinwelle, also zwischen - 1,4 und - 1,8 V steil an. Da diese Störung des Papierleerwertes auch nach Verwendung von gewaschenen und spezialgereinigten Papieren nicht beseitigt werden konnte, suchten wir daraufhin eine andere Ursache. Hierbei erwies sich die freie Salzsäure (Nikotin wurde als Chlorhydrat mit Säure-Überschuß aufgetragen) als Hauptstörfaktor, indem sie die reine Ammoniumchloridpuffer-Kurve in ihrem charakteristischen Verlauf fälschte. Da sich durch Auftropfen von Ammoniak eine genaue Neutralisation der Salzsäure nicht ermöglichen läßt, die pH-Verschiebung in den sauren Bereich - wie auch in den zu stark alkalischen - jedoch für die Nikotinmessung unbrauchbar ist, führten wir die Neutralisation durch Einhängen der Papierchromatogramme in Ammoniakatmosphäre durch. (Siehe auch S. 4-6)

Da nach dieser Maßnahme die Kapillarelation immer noch verfälschte Kurven ergab, gingen wir zur einfachen Lösungs-Elution über, indem wir das auszuwertende Papier in kleine Streifen schnitten und mit 4 ml Ammoniumchloridpuffer unter mehrmaligem Schütteln extrahierten. Nach Verlauf einer Stunde unterzogen wir das Eluat einer polarographischen

Messung und erhielten jetzt auch im Leerversuch eine reine unverfälschte Pufferkurve. Figur 4 zeigt die Kurve eines Papierleerwertes und die Kurve nach Elution eines Nikotinfleckes (beide Kurven ohne Stickstoffbegasung). Nach mehreren Messungen änderte sich ab einer Stunde Elutionsdauer die Stufenhöhe nicht mehr. Diese Zeit reicht aus, das gesamte Nikotin aus dem Papier herauszulösen. Das Eluat konnte sogar unfiltriert zur Messung verwandt werden, da kleine Papierfasern keinen störenden Einfluß auf die Kurvenzeichnung haben. Damit war eine brauchbare Papierelution für die Nikotinextraktion gefunden.

#### Anfertigung von Eichkurven:

Der Vergleich von Figur 1 und 4 ergibt, daß die Nikotin-stufen nach Papierelution größer sind als die der Messungen reiner Nikotin-Ammoniumchloridpuffer-Lösungen bei gleicher Nikotinkonzentration. Deshalb wurde es erforderlich, neue Eichkurven mit Eluaten aus Papierchromatogrammen aufzustellen. Jeweils zwei Proben verschiedener Nikotinchlorhydratlösungen steigender Konzentration ( $2\mu\text{g}$ ,  $6\mu\text{g}$ ,  $8\mu\text{g}$ ,  $12\mu\text{g}$ ,  $20\mu\text{g}$  und  $28\mu\text{g}$  Nikotin) wurden neben einer später zu besprühenden Nikotin-Testlösung auf ein 15 cm breites Papierchromatogramm (siehe Seite 10) aufgetragen. Die ge-

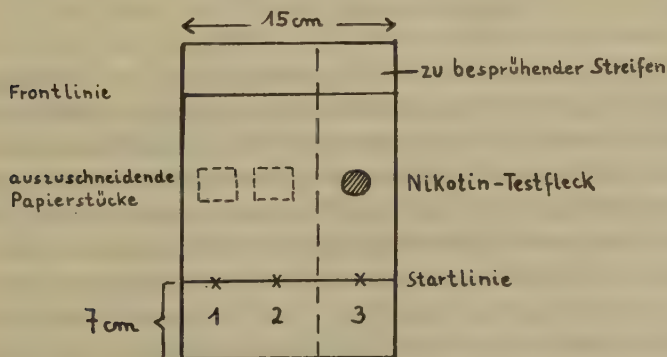


Abb. 6  
Schema

trockneten Papierchromatogramme wurden dann - wie auf Seite 10 beschrieben - weiterbehandelt, der Rf-Wert des Nikotin-Testfleckes bestimmt, in gleicher Höhe die polarographisch auszuwertenden Papierflecke ausgeschnitten (Schema hierzu in Abb. 6, Seite 19) und in kleinen Streifen mit 4 ml Ammoniumchloridpuffer extrahiert. Nach einer Stunde begasten wir die Lösung zwei Minuten mit Stickstoff, entnahmen einen Tropfen und polarographierten ihn bei  $10 \mu\text{A}$  Empfindlichkeit. Von jeder Eichlösung wurden mehrere Kurven aufgenommen, um einen genaueren Mittelwert zu erhalten. Diese Versuchsreihe wiederholten wir noch zweimal mit neu hergestellten Eichlösungen. Eine der drei Meßreihen geben die in Figur 5 abgebildeten Kurven wieder. Mit den Mittelwerten der Stufenhöhen wurde wiederum eine Fehlerberechnung aufgestellt. Diese ist mit der graphischen Darstellung der daraus resultierenden Eichgeraden im Anhang (siehe Seite 3&ff.) ersichtlich.

Ergebnis: Eluate aus Papierchromatogrammen ergaben bei der polarographischen Messung einwandfreie Leerwertkurven, d.h. diese Kurven stimmten mit reinen Ammoniumchloridpuffer-Kurven überein. Nikotineluate steigender Konzentration wurden polarographiert und eine Eichgerade ermittelt. Die statistische Auswertung der Versuchsreihe ergab eine Irrtumswahrscheinlichkeit von etwa 1%.

Aus diesen Versuchen ist zu entnehmen, daß die Polarographie bei quantitativen Nikotinmessungen eine relativ hohe Empfindlichkeit gewährleistet und diese auch unter Verwendung von Eluaten aus Papierchromatogrammen nicht wesentlich herabgesetzt wird. Daraus ergibt sich, daß mit Hilfe dieses Verfahrens auch eine Nikotinbestimmung im Blut möglich sein müßte, allerdings nicht auf direktem Wege. Man wird das Nikotin vom Blut - wie in unseren qualitativen Versuchen - abtrennen und reinigen müssen, bevor es für eine polarographische quantitative Bestimmung verwendbar ist.

E. D i s k u s s i o n   d e r   E r g e b n i s s e

Unsere Untersuchungen hatten vorerst das Ziel, im Raucherblut enthaltenes Nikotin zu isolieren und q u a - l i t a t i v nachzuweisen. Da naturgemäß ein umfangreiches Aufbereitungsverfahren, welches wegen der geforderten Spezifität hier unumgänglich schien, mit großen Verlusten verbunden sein muß, war eine Aufarbeitungstechnik zu schaffen, die diese Verluste möglichst gering hielt. In verschiedenen Einzelversuchen haben wir Nichtraucherblutproben wechselnde Mengen Nikotin zugesetzt, dieses durch soda-alkalische Dialyse und anschließende Perforation dem Blut wieder entzogen und mittels Papierchromatographie qualitativ erfaßt. Die Größe des Verlustes konnte jeweils nur grob durch Vergleich der Farbintensität von Nikotin-Testflecken und Blut-Nikotinflecken geschätzt werden. Da auch noch bei Konzentrationen von 10 µg Nikotin pro 10 ml Blut ein solcher Vergleich keine großen, dem Auge sichtbaren Farbunterschiede ergab, war zu vermuten, daß sich der durch die Aufarbeitung des Blutes bedingte Nikotinverlust in noch tragbaren Grenzen zu halten scheint.

Es ließ sich weiterhin in hohem Grade wahrscheinlich machen, daß die aus Raucherblut extrahierte Substanz tatsächlich Nikotin ist. Hierzu nahmen wir nach papierchromatographischer Vortrennung ein UV-Absorptionsspektrum des eluierten Analysenfleckes auf. Das ermittelte Maximum stimmte mit dem des reinen Nikotins überein. Dies spricht für die Wirksamkeit des aufgestellten dem qualitativen Nachweis dienenden Trennverfahrens.

Für die q u a n t i t a t i v e Bestimmung des Nikotins in Lösungen erschien uns die P o l a r o g r a -

p h i e infolge ihrer hohen Empfindlichkeit besonders geeignet. Wir haben uns in unseren Versuchen jedoch nur mit quantitativen Bestimmungen w ä s r i g e r Nikotinlösungen bzw. nikotinhaltiger wäßriger Eluate aus Papierchromatogrammen des reinen Alkaloids befaßt. Dabei stellten wir an Hand von Versuchsreihen Eichkurven auf. Noch eine Konzentration von  $1 \mu\text{g}$  Nikotin pro ml Pufferlösung wurde im Polarogramm sichtbar, was für eine genügend hohe Empfindlichkeit sprach.

Da bei späteren Blut-Versuchen zur quantitativen Nikotinbestimmung n u r Eluate aus Papierchromatogrammen - nicht aber reine Nikotinlösungen - für die polarographische Messung in Frage kommen, bedeutete es weiterhin einen großen Vorteil für die Genauigkeit der polarographischen Messung, den Papierfehler durch Aufstellen von Eichkurven mit nikotinhaltigen Eluaten aus Papierchromatogrammen praktisch ausschalten zu können. Die quantitative Bestimmung des Nikotins im Blut nach Körperpassage soll späteren Arbeiten vorbehalten bleiben, da für eine Beurteilung großes Versuchsmaterial erforderlich ist und die Auswertung solcher Versuchsserien über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen würde.

Wenn auch der sichere Nachweis erbracht werden konnte, daß Nikotin auf dem von uns vorgeschlagenen Wege, nämlich mittels soda-alkalischer Dialyse, Perforation und Papierchromatographie, qualitativ bis zu einer Größenordnung von etwa  $1 \mu\text{g/ml}$  im Blut erfaßt werden kann, und wir andererseits ebenso sicher zeigen konnten, daß reines Nikotin nach Papierchromatographie auf gepufferten Papieren polarographisch genau so bestimmbar ist wie in wäßrigen Lösungen, so können wir trotzdem aus den oben genannten Gründen nicht sagen, ob eine Kombination des von uns erarbeiteten qualitativen Nikotinnachweises im Blut mit der hier ebenfalls erprobten quantitativen polarographischen

Analyse wäßriger Nikotinlösungen (Papiereluat) mit Sicherheit eine quantitative Bestimmung des Nikotinspiegels im Rauchherblut ermöglichen wird. Vieles wäre dazu noch zu klären. So wissen wir z.B. noch nicht, ob sich bei der quantitativen Dialyse nach 24 Stunden das Gleichgewicht zwischen Dialysat und Dialyserückstand eingestellt hat, obwohl dies bei Zimmertemperatur zu erwarten ist.

Weiterhin unsicher ist noch die Frage, ob Nichtraucherblut immer frei von den quantitativen polarographischen Nikotinnachweis störenden Substanzen ist. Sollte dies der Fall sein, dann könnte damit bewiesen werden, daß die Polarographie in Kombination mit soda-alkalischer Dialyse, Perforation und Papierchromatographie einen spezifischeren Nachweis für Nikotin im Raucherblut ermöglicht als die von WOLFF und Mitarb. (4,5,6) entwickelte Methode der alkalischen Wasserdampfdestillation, bei der im Nichtraucherblut häufig ein sog. "nicotine blank" (5) als Störfaktor auftritt.

Für den Erfolg einer späteren quantitativen Nikotinbestimmung im Raucherblut scheint uns auch der Zeitpunkt der Blutentnahme in Bezug auf den Rauchabschluß nicht ohne Bedeutung zu sein; denn es ist anzunehmen, daß das vom Körper aufgenommene Nikotin relativ schnell aus dem Blut verschwindet und deshalb nicht lange genug nachweisbar bleibt.

Über den Abbau und die Verteilung des Nikotins im tierischen Organismus ist bisher noch recht wenig bekannt. Die Angaben verschiedener Autoren widersprechen sich häufig. So sollen nach PIERCE (33), BAUMBERGER (34) und WENUSCH (35) bei dem Genuß von 20 Zigaretten etwa 60 mg Nikotin vom Organismus aufgenommen werden. Wenn sich

diese Alkaloidmenge gleichmäßig auf alle Körperflüssigkeit verteilt, errechnet sich daraus nach WOLFF, HAWKINS und GILES (6) eine Nikotinkonzentration von 1,0 bis 1,5 mg/l für den nikotingewohnten Menschen. Würde die gesamte Nikotindosis (= 60 mg) lediglich im Blut absorbiert werden, so würde die Menge pro Liter 10 mg überschreiten. Da dies jedoch nicht der Fall sein kann, nahmen WOLFF und Mitarb. (6) an, daß das Nikotin durch die Zellmembranen diffundiert und daher etwa in gleicher Konzentration in den extravaskulären Flüssigkeiten vorkommt.

Gleichzeitig geht dabei der biologische Abbau des Nikotins vor sich. Auf welche Weise dieser erfolgt, ist noch nicht genau geklärt. Die meisten Untersuchungen wurden auf pharmakologischem Wege durchgeführt. Die Entgiftung dürfte nach DIXON (36) hauptsächlich in der Leber stattfinden, wobei ein fermentativer Abbau für möglich gehalten wird. Nach WERLE, SCHIEVELBEIN und SPIETH (37) wird das Nikotin im tierischen Organismus sehr wahrscheinlich zunächst im Pyrrolidinring oxydativ aufgespalten und dann über die intermediäre Bildung substituierter Pyridine zu einfacheren Verbindungen wie etwa Karbonsäuren, Ammoniak und Methylamin weiter abgebaut, so daß es sich nicht mehr im Organismus nachweisen läßt. Daß die Leber bei diesem Abbau die Hauptrolle spielt, konnten auch BIEBL, ESSEX und MANN (38) bestätigen. Sie fanden in Durchströmungsversuchen am Herz-Lungen-Leberpräparat von Hunden, daß Nikotin, welches dem durchströmenden Blut zugesetzt wurde, recht bald aus dem Kreislauf verschwindet. Demgegenüber verblieb das Nikotin im Blut, wenn sich der Kreislauf nur auf Herz und Lungen beschränkte. An eine nikotinzerstörende Fähigkeit der

Lungen wurde deshalb von dieser Forschergruppe nicht geglaubt.

Diese Annahme steht jedoch im Gegensatz zu der von WERLE (39), der an Warburgschen Gewebsschnitten verschiedener Organe wie Leber, Niere und Lunge zeigen konnte, daß das Nikotin auch in diesen Geweben abgebaut wird und nicht nur in der Leber. Weiterhin fand WERLE, daß die Entgiftung des Nikotins an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden ist, und glaubte, daraus schließen zu können, daß dieser Abbau durch ein gegen Blausäure und Kohlenoxyd empfindliches Ferment erfolgt. WERLE und Mitarb. (37,39, 40) konnten außerdem nachweisen, daß das Blut keinen Einfluß auf den Nikotinabbau hat, wohl aber einen Teil des Nikotins absorbiert.

Diese Gründe mögen dafür verantwortlich sein, daß nach KENNIS, TURNBULL und BOWMAN (41) nur 10% des resorbierten Nikotins im Harn ausgeschieden werden, wobei WERLE (39) diesen Wert sogar nur mit 2% einschätzt. Auch hinsichtlich der Ausscheidungsgeschwindigkeit findet man in der Literatur sehr widersprechende Angaben. NOETHER (42) zeigte im Tierversuch und auch beim Menschen, daß nach dem Genuß von einer Zigarre das Maximum der Ausscheidung nach drei Stunden erreicht und der Harn bereits nach acht Stunden wieder nikotinfrei war, während JATZKEWITZ (43) noch 27 Stunden nach dem Genuß einer einzigen Zigarette Nikotin im Harn nachweisen konnte und HELMER, KOHLSTAEDT und PAGE (44) sogar noch nach vier Tagen, wobei letztere allerdings ihre Ergebnisse auf das Blut starker Raucher bezogen. Im Hinblick auf die Forschungsergebnisse über den Nikotinabbau müssen derartig lange Ausscheidungszeiten angezweifelt werden, während die Angaben von NOETHER für wahrscheinlicher zu halten sind. Daraus ließe sich der Schluß ziehen,

daß der Nikotinspiegel im Blut von der Ausscheidung im Harn abhängig ist; denn wenn im Urin keine nachweisbaren Nikotinmengen mehr zu finden sind, dürfte auch der Blutspiegel normalisiert sein.

Sollte es gelingen, auf unseren Untersuchungen und Ergebnissen aufzubauen und eine Methode zum quantitativen Nikotinnachweis im Raucherblut zu entwickeln, so könnte diese einen Weg zeigen, bei gleichzeitig zu überwachendem Blutspiegel die Nikotinausscheidung zu verfolgen, sowie die quantitative Abbaugeschwindigkeit bei gewohnten und mäßigen Rauchern zu bestimmen. Außerdem wäre es pathophysiologisch bedeutsam, Aufschluß über die Zusammenhänge zu bekommen, die vermutlich zwischen der Höhe des Nikotinspiegels im Blut und den zahlreichen durch Nikotin mit verursachten Krankheiten am Herz und Kreislaufsystem bestehen.

## F. Zusammenfassung

1. Aus mit Nikotin versetztem Nichtraucherblut sowie aus Raucherblut konnte unter Anwendung von soda-alkalischer Dialyse, Perforation und Papierchromatographie auf gepufferten Papieren das Alkaloid abgetrennt und qualitativ mit Sicherheit erfaßt werden. Der Nachweis erfolgte sowohl durch Bestimmung des  $R_f$ -Wertes mittels Farbreaktion nach MUNIER/MACHEBOEUF (Testflecken-Methode) als auch durch Aufnahme des UV-Absorptionsspektrums. Nikotin, das Nichtraucherblutproben zugesetzt und nachträglich auf dem von uns beschriebenen Wege wieder isoliert wurde, konnte bis zu einer Größenordnung von etwa  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  qualitativ erfaßt werden.
2. Es wurden die günstigsten Bedingungen zur quantitativen polarographischen Bestimmung der reinen Nikotinbase in wäßrigen Lösungen und in Eluaten von Papierchromatogrammen ermittelt und durch statistische Auswertung von Eichkurven eine Irrtumswahrscheinlichkeit von etwa 1% errechnet. Noch eine Konzentration von  $1\text{ }\mu\text{g}$  Nikotin pro ml Ammoniumchloridpuffer-Lösung wurde im Polarogramm sichtbar.
3. Abschließend wurde die Möglichkeit einer quantitativen Nikotinbestimmung im Raucherblut durch Kombination der von uns erarbeiteten qualitativen Nachweismethode für Nikotin im Raucherblut mit der hier ebenfalls erprobten quantitativen polarographischen Messung wäßriger Nikotinlösungen (Papiereluat) diskutiert.

G.     A n h a n g

I.   Polarographische Kurven  
     (Figur 1 - 5)

II.   Statistische Auswertung der Eichkurven

# I. Polarographische Kurven

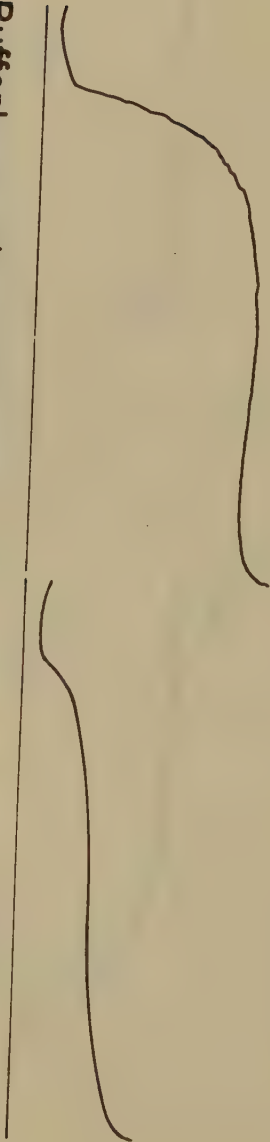


10 µg Nikotin /ml Puffer      0,1m Ammoniumchloridpuffer (pH 7,5)

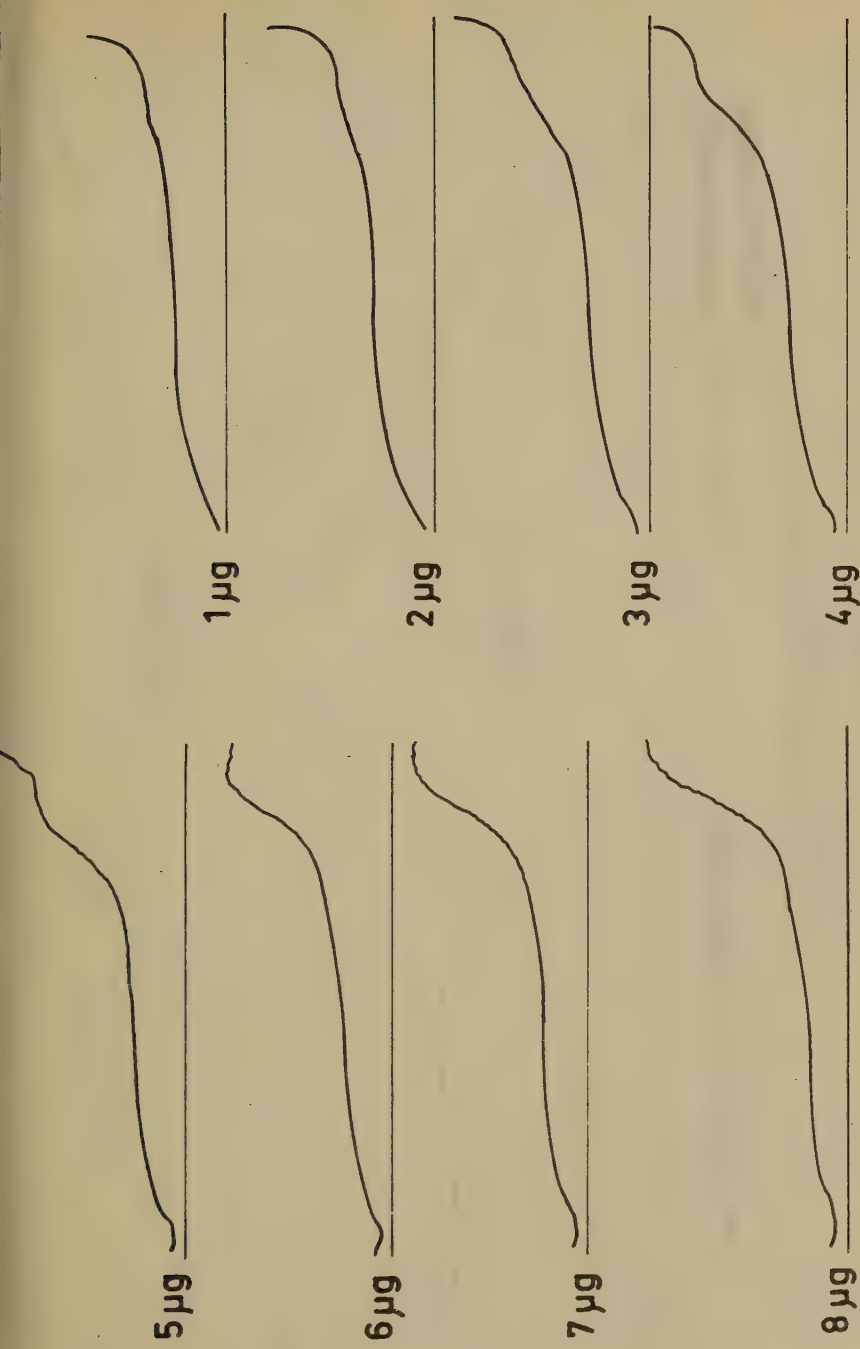
Figur 1

Pufferkurve ohne Stickstoff -  
begasung

Pufferkurve mit Stickstoff -  
begasung



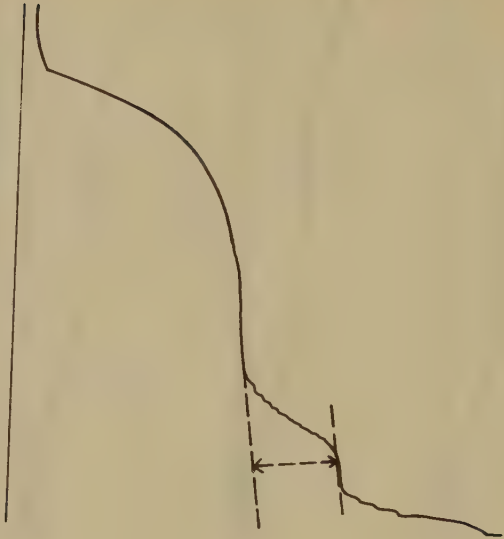
Figur 2



Eichkurven reiner Nikotinlösungen ( 1–8 µg/ml )

Figur 3

Papierelution eines  $10\ \mu\text{g}$   
Nikotinfleckes

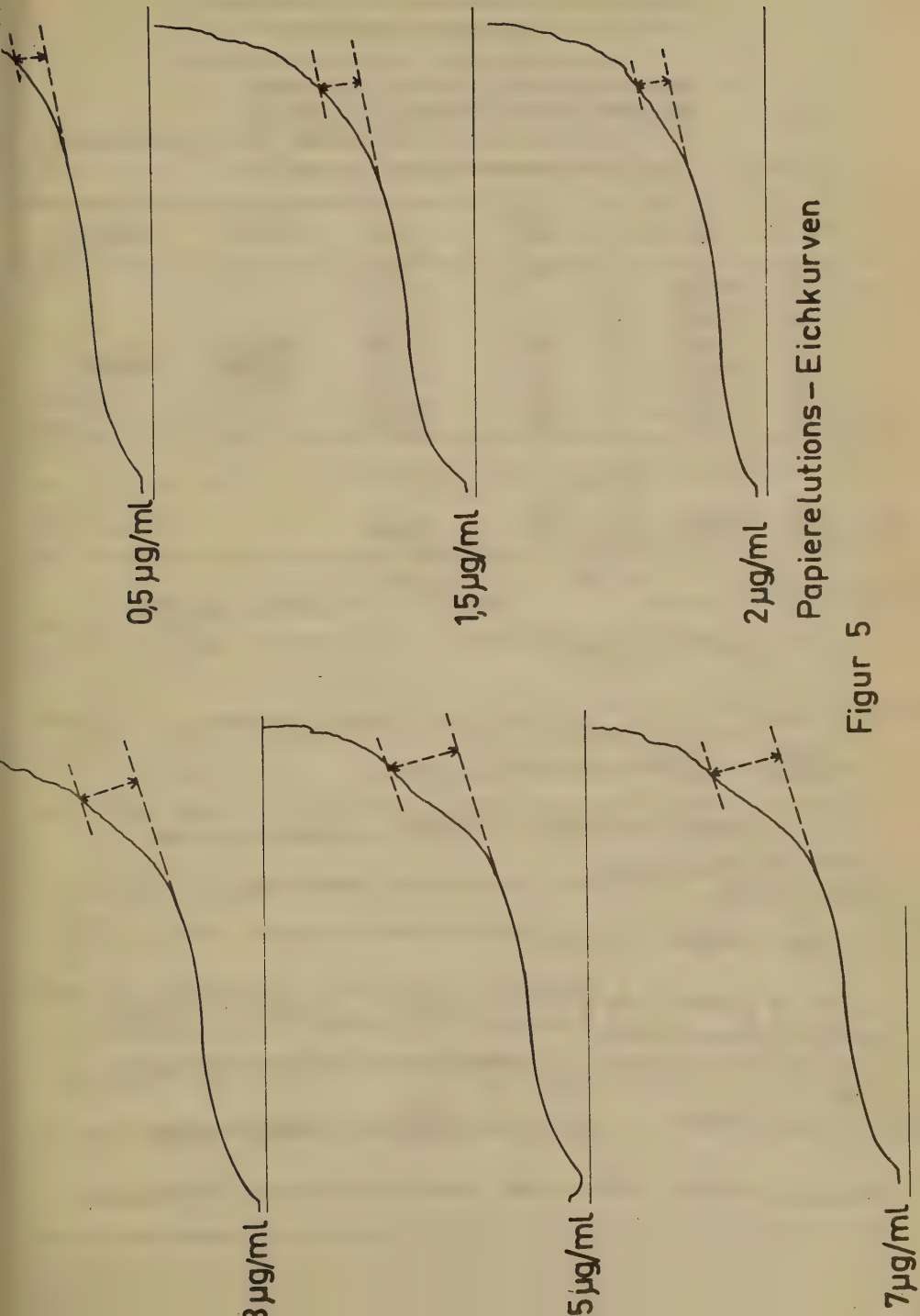


(ohne Stickstoffbegasung)

Leerwert – Elutionskurve



Figur 4



Papierelutions – Eichkurven

Figur 5

## II. Statistische Auswertung der Eichkurven

### 1. Fehlerberechnung für die Eichkurven wässriger Nikotinlösungen - 10 $\mu$ A -

$n$  = Versuchszahl,  $x$  = Stufenhöhe in cm (Mittelwerte)

$y$  = Nikotinkonzentration ( $\mu$ g/ml)

| $n$ | $x_i$ | $x_i^2$ | $y_i$ | $y_i^2$ | $x_i y_i$ | $\sum x_i \sum y_i$ | $n \sum x_i y_i$ |
|-----|-------|---------|-------|---------|-----------|---------------------|------------------|
| 1   | 0,20  | 0,0400  | 1     | 1       | 0,20      |                     |                  |
| 2   | 0,35  | 0,1225  | 2     | 4       | 0,70      |                     |                  |
| 3   | 0,60  | 0,3600  | 3     | 9       | 1,80      |                     |                  |
| 4   | 0,97  | 0,9409  | 4     | 16      | 3,88      |                     |                  |
| 5   | 1,32  | 1,7424  | 5     | 25      | 6,60      | <u>314,28</u>       | <u>409,68</u>    |
| 6   | 1,28  | 1,6384  | 6     | 36      | 7,68      |                     |                  |
| 7   | 1,73  | 2,9929  | 7     | 49      | 12,11     |                     |                  |
| 8   | 2,28  | 5,1984  | 8     | 64      | 18,24     |                     |                  |

$$\sum x_i = \sum x_i^2 = \sum y_i = \sum y_i^2 = \sum x_i y_i =$$

$$n=8 \quad \underline{\underline{8,73}} \quad \underline{\underline{13,0355}} \quad \underline{\underline{36}} \quad \underline{\underline{204}} \quad \underline{\underline{51,21}}$$

$$\frac{\sum x_i}{n} = \frac{8,73}{8} = 1,09125$$

$$n \sum x_i^2 = 8 \cdot 13,0355 = 104,2840$$

$$(\sum x_i)^2 = 8,73^2 = 76,2129$$

$$n S x^2 = n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 = 104,2840 - 76,2129 = 28,0711$$

$$s^2 = \frac{n S x^2}{n(n-1)} = \frac{28,0711}{56} = 0,50126 = 0,5013$$

$$s = 1/2 \lg 0,5013 = 0,7001-1 = \frac{1,7001-2}{2} = 0,8501-1 = 0,7081$$

$$s = 0,71 \text{ cm} \quad \text{= mittlere quadratische Abweichung}$$

$$S^2 = \frac{s^2}{n-2} = \frac{0,5013}{6} = 0,08355$$

$$S = 1/2 \lg 0,08355 = \frac{0,9219-2}{2} = 0,46045-1 = 0,4605-1 = 0,28875$$

$$S = 0,29 \text{ cm} = 2,9 \text{ mm} \quad \text{= Standardfehler des Mittelwertes}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = 1,09125$$

$$t = \frac{\bar{x}}{S} = \frac{1,09125}{0,29} = 3,76379 = 3,7638$$

$$P(\text{für } n-2) = 0,01 - 0,05 = 1-5\% \quad (\text{nach Student'scher Verteilung})$$

# Regressionsrechnung

(Eichkurven wäßriger Nikotinlösungen)

$$\sum x_i = 8,73 \quad \sum y_i = 36 \quad \sum x_i y_i = 51,21$$

$$(\sum x_i)^2 = 76,2129 \quad (\sum y_i)^2 = 1296 \quad \sum x_i \sum y_i = 314,28$$

$$\sum x_i^2 = 13,0355 \quad \sum y_i^2 = 204 \quad n \sum x_i y_i = 409,68$$

$$n \sum x_i^2 = 104,284 \quad n \sum y_i^2 = 1632$$

$$n \sum x_i^2 = 104,2840 \quad n \sum y_i^2 = 1632$$

$$\frac{-(\sum x_i)^2}{n \sum x_i^2} = \frac{-76,2129}{28,0711} \quad \frac{-(\sum y_i)^2}{n \sum y_i^2} = \frac{-1296}{336}$$

$$n \sum x_i^2 = 28,0711 \quad n \sum x_i y_i = 409,68$$

$$n \sum y_i^2 = 336 \quad \frac{-(\sum x_i \sum y_i)}{n \sum x_i y_i} = \frac{-314,28}{95,40}$$

$$\frac{n \sum x_i y_i}{n \sum x_i^2} = \frac{95,4}{28,07} = 3,3986 = b_{xy} \quad (\text{Regressionskoeffizient})$$

$$\frac{n \sum x_i y_i}{n \sum y_i^2} = \frac{95,4}{336} = 0,2839 = b_{yx} \quad (\text{Regressionskoeffizient})$$

$$B_{xy} = b_{xy} \cdot b_{yx} = 0,96486254 = \underline{\underline{0,9649}} \quad (\text{Bestimmtheitsmaß - Irrtumswahrscheinlichkeit})$$

$\underline{\underline{= \text{unter } 1\%}}$

$$P = 0,001 = 0,1\%$$

$$\sqrt{B_{xy}} = 0,9824 = \text{Korrelationskoeffizient}$$

Lage der Eichgeraden (siehe Abb., Seite 37)

Schnittpunkt beider Geraden ( $b_{xy}$  und  $b_{yx}$ ):  $\bar{y} = 4,5 \quad \bar{x} = 1,09$

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n} = \frac{36}{8} = 4,5 \quad \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{8,73}{8} = 1,09$$

Im Schnittpunkt beider Geraden werden  $\text{tg } b_{xy} = 74^\circ$  und  $\text{tg } b_{yx} = 15,6^\circ$

angetragen. Die Verbindungslinie beider Punkte mit dem Schnittpunkt ergibt jeweils eine Gerade, wovon erstere (bxy) die Eichgerade für die Nikotinwerte darstellt. Der Schnittpunkt der Geraden byx mit der y-Achse gibt Auskunft über das Maß der Verunreinigung.

y-Achse =  $\mu\text{g/ml}$  Nikotin

x-Achse = Stufenhöhen in cm

Maßeinheit der Achsen für die errechneten Winkel:  $1\mu\text{g} = 1\text{ cm}$

Wegen größerer Genauigkeit bei der Ablesung der Werte wurde der Maßstab der x-Achse um 1 : 5 vergrößert, der der y-Achse jedoch belassen. Diese Änderung des Maßstabes erforderte natürlich auch eine Veränderung der Winkel im gleichen Verhältnis:

$$\frac{\text{tg } b_{xy}}{5} = 34,2^\circ \qquad \frac{\text{tg } b_{yx}}{5} = 3,24^\circ$$

Neuer Maßstab: y-Achse:  $1\mu\text{g} = 2\text{ cm}$

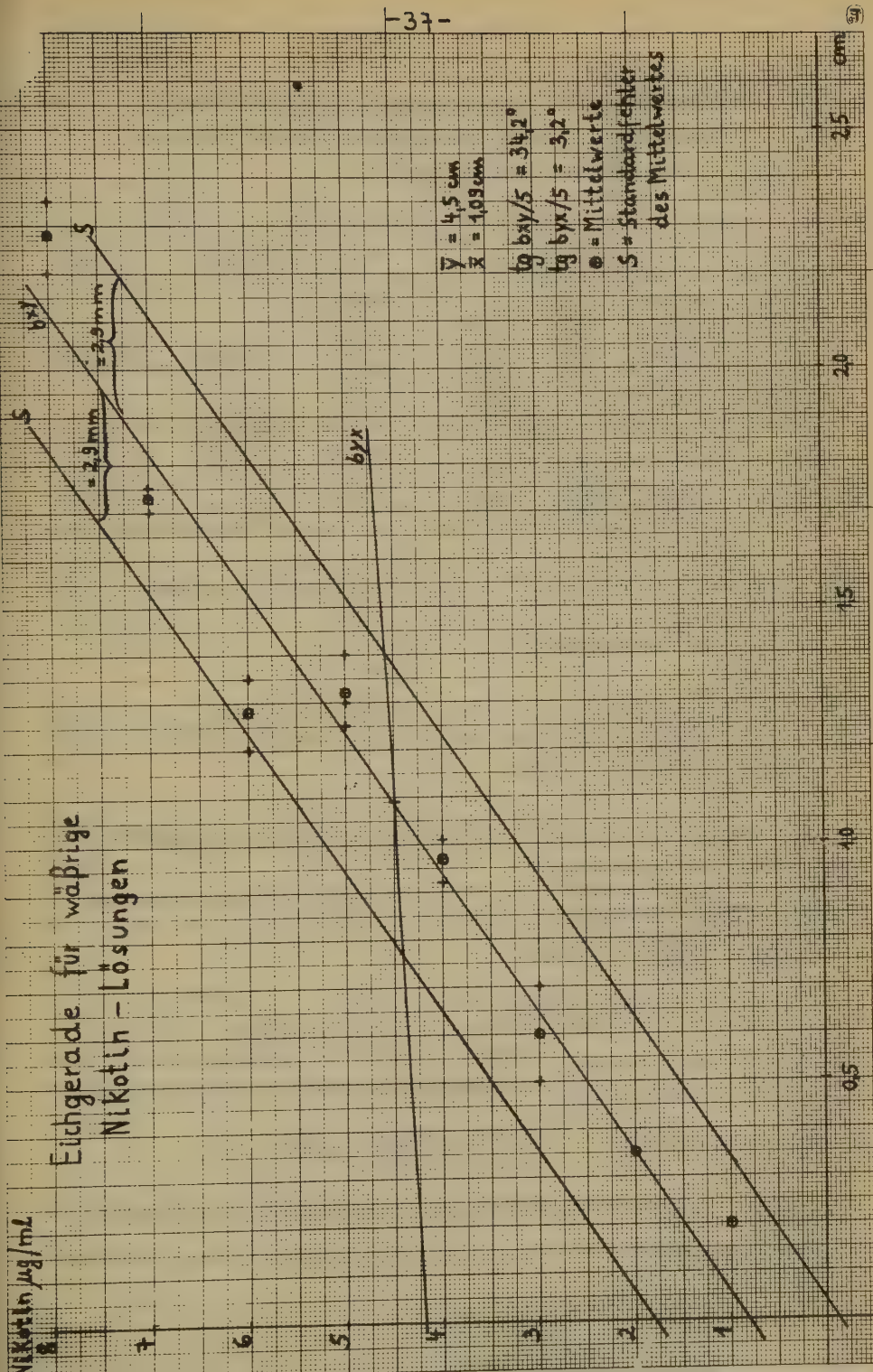
x-Achse:  $1\text{ cm} = 10\text{ cm}$

#### Diskussion der statistischen Ermittlung

Die Lage der Eichgeraden ergibt eine untere Nachweisgrenze von  $0,85\mu\text{g}$  Nikotin pro ml Analysenlösung. Der Anstieg der Verunreinigung (byx) ist gering, da die Gerade byx ziemlich flach verläuft. Außer der Eichgeraden bxy wurden beiderseits davon im Abstand von 2,9 mm (horizontal) die dem Standardfehler des Mittelwertes entsprechenden Strecken eingezeichnet. Bis auf einen Meßwert liegen alle eingezeichneten Punkte der Meßreihe innerhalb der zulässigen Schwankungsbreite.

Nikotin  $\mu\text{g/mL}$

Eichgerade für wäßrige  
Nikotin-Lösungen



## 2. Fehlerberechnung für die Papierelutions-Eichkurven - 10 $\mu$ A -

n = Versuchszahl, x = Stufenhöhe in cm (Mittelwerte)

y = Nikotinkonzentration ( $\mu$ g/ml)

| n          | $x_i$        | $x_i^2$        | $y_i$        | $y_i^2$        | $x_i y_i$        | $\sum x_i$    | $\sum y_i$ | $n \sum x_i y_i$ |
|------------|--------------|----------------|--------------|----------------|------------------|---------------|------------|------------------|
| 1          | 0,53         | 0,2809         | 0,5          | 0,25           | 0,265            |               |            |                  |
| 2          | 0,75         | 0,5625         | 1,5          | 2,25           | 1,125            |               |            |                  |
| 3          | 0,77         | 0,5929         | 2,0          | 4,00           | 1,540            |               |            |                  |
| 4          | 1,23         | 1,5129         | 3,0          | 9,00           | 3,690            | <u>116,47</u> |            | <u>142,62</u>    |
| 5          | 1,40         | 1,9600         | 5,0          | 25,00          | 7,000            |               |            |                  |
| 6          | 1,45         | 2,1025         | 7,0          | 49,00          | 10,150           |               |            |                  |
| <hr/>      |              |                |              |                |                  |               |            |                  |
|            | $\sum x_i =$ | $\sum x_i^2 =$ | $\sum y_i =$ | $\sum y_i^2 =$ | $\sum x_i y_i =$ |               |            |                  |
| <u>n=6</u> | <u>6,13</u>  | <u>7,0117</u>  | <u>19,0</u>  | <u>89,5</u>    | <u>23,770</u>    |               |            |                  |

$$\frac{\sum x_i}{n} = \frac{6,13}{6} = 1,02166 \quad n \sum x_i^2 = 6 \cdot 7,0117 = 42,0702$$

$$(\sum x_i)^2 = 6,13^2 = 37,5769$$

$$n S x^2 = n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 = 42,0702 - 37,5769 = 4,4933$$

$$s^2 = \frac{n S x^2}{n(n-1)} = \frac{4,4933}{30} = 0,1498$$

$$s = 1/2 \lg 0,1498 = 0,1755-1 = \frac{1,1755-2}{2} = 0,58775-1 = 0,3871$$

$$s = 0,39 \text{ cm} = 3,9 \text{ mm} \quad = \text{mittlere quadratische Abweichung}$$

$$S^2 = \frac{s^2}{n-2} = \frac{0,1498}{4} = 0,03745$$

$$S = 1/2 \lg 0,03745 = \frac{0,5735-2}{2} = 0,28675-1 = 0,2868-1 = 0,19355$$

$$S = 0,19 \text{ cm} = 1,9 \text{ mm} \quad = \text{Standardfehler des Mittelwertes}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = 1,02166 \quad t = \frac{\bar{x}}{S} = \frac{1,0217}{0,19} = 5,278$$

$$P(\text{für } n-2) = 0,0025 = 0,25\% \quad (\text{nach Student'scher Verteilung})$$

Regressionsrechnung  
(Papierelutions-Eichkurven)

$$\begin{array}{lll} \sum x_i & = 6,13 & \sum y_i = 19,0 & \sum x_i y_i = 23,77 \\ (\sum x_i)^2 & = 37,58 & (\sum y_i)^2 = 361,0 & \sum x_i \sum y_i = 116,47 \\ \sum x_i^2 & = 7,01 & \sum y_i^2 = 89,5 & n \sum x_i y_i = 142,62 \\ n \sum x_i^2 & = 42,07 & n \sum y_i^2 = 537,0 & \end{array}$$

$$\begin{array}{ll} n \sum x_i^2 = 42,07 & n \sum y_i^2 = 537,0 \\ - (\sum x_i)^2 = -37,58 & - (\sum y_i)^2 = -361,0 \\ \hline n S x_i^2 = 4,49 & n S y_i^2 = 176,0 \end{array}$$

$$\begin{array}{ll} n S x_i^2 = 4,49 & n \sum x_i y_i = 142,62 \\ n S y_i^2 = 176,0 & - (\sum x_i \sum y_i) = -116,47 \\ \hline n S x_i y_i = 26,15 & \end{array}$$

$$\frac{n S x_i y_i}{n S x_i^2} = \frac{26,15}{4,49} = 5,824 = \underline{\underline{b_{xy}}} \quad (\text{Regressionskoeffizient})$$

$$\frac{n S x_i y_i}{n S y_i^2} = \frac{26,15}{176,0} = 0,14857 = \underline{\underline{b_{yx}}} \quad (\text{Regressionskoeffizient})$$

$$B_{xy} = b_{xy} \cdot b_{yx} = 0,86527168 = \underline{\underline{0,8653}} \quad (\text{Bestimmtheitsmaß: Irrtumswahrscheinlichkeit unter } \underline{\underline{1\%}})$$

$$P = 0,001 = 0,1\% \quad \sqrt{B_{xy}} = 0,93 = \text{Korrelationskoeffizient}$$

Lage der Eichgeraden (siehe Abb., Seite 41)

Schnittpunkt beider Geraden ( $b_{xy}$  und  $b_{yx}$ ):  $\bar{y} = 3,2 \text{ cm}$ ,  $\bar{x} = 1,02 \text{ cm}$

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n} = \frac{19}{6} = 3,166 \quad \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{6,13}{6} = 1,0216$$

$$\frac{tg \ b_{xy}}{5} = 49,3^\circ = \text{Winkel für die Eichgerade } (b_{xy})$$

$$\frac{tg \ b_{yx}}{5} = 2,0^\circ = \text{Winkel für die Gerade der Verunreinigung } (b_{yx})$$

Maßstab: y-Achse: 1  $\mu$ g Nikotin/ml = 2 cm

x-Achse: 1 cm = 10 cm

### Diskussion der statistischen Ermittlung

Die Lage der Eichgeraden (bxy) ergibt eine untere Nachweisgrenze von 0,075  $\mu$ g Nikotin pro Milliliter Analysenlösung. Die Gerade byx verläuft flach, d.h. der Anstieg der Verunreinigung ist gering. Im Abstand von 1,9 mm von der Eichgeraden wurden die beiden dem Standardfehler des Mittelwertes entsprechenden Geraden eingezeichnet. Bis auf zwei Meßwerte (7 u. 3  $\mu$ g/ml) liegen alle innerhalb der zulässigen Schwankungsbreite. Die zwei ausfallenden Werte ("Ausreißer") sind durch Störfaktoren bedingt, die außerhalb der Methodik liegen müssen.

### 3. Unterschiede der Regressionskoeffizienten (= Gegenüberstellung beider Eichgeraden)

a = Werte der Papierelution

b = Werte der wäßrigen Nikotinlösungen

$$Sy^2a = \frac{nSy^2a}{n} = \frac{176}{6} = 29,33 \quad Sy^2b = \frac{nSy^2b}{n} = \frac{336}{8} = 42$$

$$D = Sy^2a \cdot (1 - Bxy_a) + Sy^2b \cdot (1 - Bxy_b) = 29,33 \cdot (1 - 0,8653) + 42 \cdot (1 - 0,9649)$$

$$D = 3,950751 + 1,4742 = 5,424951$$

$$Sx^2a = \frac{nSx^2a}{n} = \frac{4,49}{6} = 0,7483 \quad Sx^2b = \frac{nSx^2b}{n} = \frac{28,0711}{8} = 3,5089$$

$$E = Sx^2a + Sx^2b = 0,7483 + 3,5089 = 4,2572$$

$$L = \frac{D \cdot E}{Sx^2a \cdot Sx^2b \cdot (n_a + n_b - 4)} = \frac{5,425 \cdot 4,257}{0,7483 \cdot 3,5089 \cdot 10} = 0,8795 \quad \sqrt{L} = 0,9378$$

$$t = \frac{bxy_a - bxy_b}{\sqrt{L}} = \frac{5,824 - 3,3986}{0,9378} = \frac{2,4254}{0,9378} = 2,5874$$

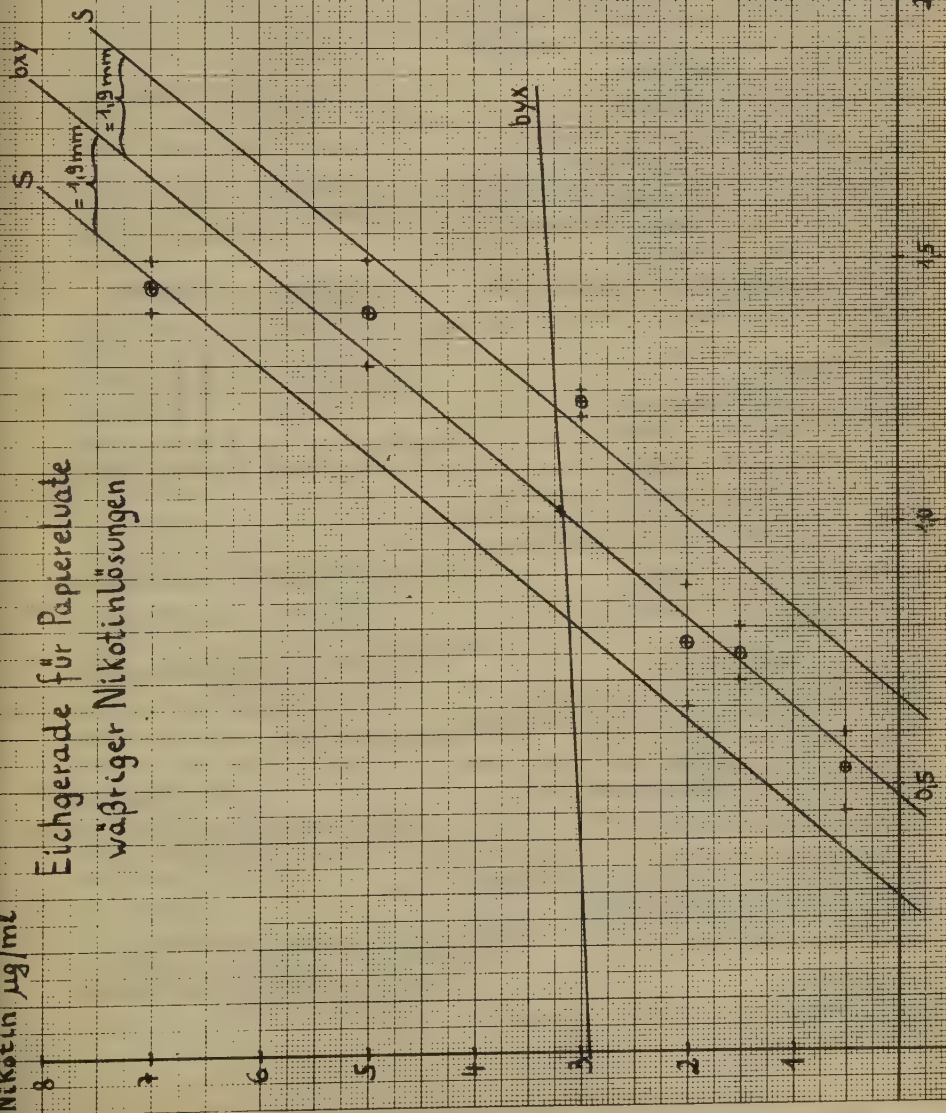
$$t_{(n_a + n_b - 4)} = 2,5874 \longrightarrow 10 \quad ((n_a + n_b - 4) = 10)$$

$$t = 0,0125 \longleftarrow 0,01 = 1,25\% \longleftarrow 1\% \quad (\text{nach Tabelle})$$

$$t \longrightarrow (n_a + n_b - 4) = \text{Freiheitsgrad} \quad (\text{Unterschied der Elutionskurven und wäßrigen Nikotinlösungen/der beiden Eichgeraden})$$

Nikotin  $\mu\text{g/ml}$

Eichgerade für Papirelvate  
wäßriger Nikotinlösungen



$$\bar{x} = 1.02 \text{ cm}$$

$$\bar{y} = 3.2 \text{ cm}$$

$$\text{tg } b_{yx}/S = 48.3^\circ$$

$$\text{tg } b_{yx}/S = 1.3^\circ \approx 2^\circ$$

$\oplus$  = Mittelwerte

$S$  = Standardfehler

des Mittelwertes

# L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. F. Eichholtz Springer - Verlag  
Lehrbuch der Pharmakologie  
7. Auflage, S. 270  
Berlin-Göttingen-Heidelberg  
1951
2. F. Kaindl Wiener Ztschr.f.innere  
Das Problem der Nikotinwirkung. Medizin, 39, 334 (1958)
3. H. Bock Inaug.-Diss., Frankfurt  
Untersuchungen über den Einfluß des am Main, 1962  
Rauchens auf die Dunkeladaptation,  
das periphere Gesichtsfeld sowie die  
Netzhautgefäße und deren verkehrs-  
medizinische Bedeutung.
4. W.A.Wolff, M.A.Hawkins Fed. Proc., 6, 386 (1947)  
The relation of blood nicotine  
levels to type of smoking.
5. W.A.Wolff, M.A.Hawkins, W.E.Giles J.Biol.Chem., 175, 825  
The spectrophotometric estimation (1948)  
of nicotine in blood.
6. W.A.Wolff, M.A.Hawkins, W.E.Giles J.Pharmacol., 95, 145  
Nicotine in blood in relation to (1949)  
smoking.
7. M.P. Souchay Chim.analyt., 41, 445ff.  
Analyse polarographique et und 471ff. (1959)  
chimie organique.
8. J. Heyrovský, V. Nejezský Chem.News, 142, 193 (1931)  
The electro-reduction of nitric  
oxide and the estimation of nitrates  
at the dropping mercury cathode.
9. J. Heyrovský, P. Zuman VEB Verlag Technik Berlin  
Einführung in die praktische 1959  
Polarographie.
10. H.F.W. Kirkpatrick Quart.J.Pharm.Pharmacol.,  
Zitat nach M.Brezina, P.Zuman: 19, 526 (1946)  
"Die Polarographie in der Medizin,  
Biochemie und Pharmazie".  
Akadem. Verlagsges. Leipzig, 1956  
Abschnitt: Alkaloide, S. 341
11. J. Volke, V. Volkova Chem. listy, 48, 1031 (1954)  
Zitat nach M.Brezina, P.Zuman:  
"Die Polarographie in der Medizin,  
Biochemie und Pharmazie".  
Akadem.Verlagsges.Leipzig, 1956  
Kapitel Alkaloide, S. 341
12. G. Semerano Giorn. chim. ind. appl.,  
Applicazioni del metodo polaro- 14, 608 (1932)  
grafico.

13. Y. Rusconi, D. Monnier, P. E. Wenger  
Zitat nach M. Brezina, P. Zuman:  
"Die Polarographie in der Medizin,  
Biochemie und Pharmazie".  
Akadem. Verlagsges. Leipzig, 1956  
Kapitel Alkaloide, S. 341  
Anal. Chim. Acta, 5, 222  
(1951)
14. C. O. Willits, C. Ricciuti  
Amperometric Titration of Nor-  
nicotine.  
Anal. Chem., 23, 1712 (1951)
15. G. de Angelis  
Titolazione amperometrica della  
nicotina per mezzo dell' acido  
silico-12-tungstico.  
Ricerca scientifica, 21, 62  
(1951)
16. H. Hasselbach  
Die polarographische Nikotin-  
bestimmung im Tabak.  
J. prakt. Chem., 7, 338  
(1959)
17. N. Melamed, P. Nangniot, P. H. Martens  
Le comportement polarographique  
de la nicotine et de la nornico-  
tine.  
Bull. Inst. agron. et Stat.  
Rech. Gembloux, 26, 103  
(1958)
18. R. Munier, M. Macheboeuf  
Microchromatographie de partage  
des alcaloides et de diverses  
bases azotées biologiques.  
Bull. Soc. Chim. biol., 31,  
1144 (1949)
19. W. König  
Über eine neue, vom Pyridin  
derivierende Klasse von Farb-  
stoffen.  
J. prakt. Chem., 69, 105  
(1904)
20. W. König  
Verfahren zur Darstellung neuer  
stickstoffhaltiger Farbstoffe.  
Ztschr. angew. Chem., 18, 115  
(1905)
21. I. M. Hais, K. Macek  
Handbuch der Papierchromatogra-  
phie, Bd. I, S. 735, D 2b  
VEB Fischer Verlag Jena  
1958
22. I. M. Hais, K. Macek  
Handbuch der Papierchromatogra-  
phie, Bd. I, S. 735, D 3  
VEB Fischer Verlag Jena  
1958
23. H. Jatzkewitz  
Ein klinisches Verfahren zur  
Bestimmung von basischen Sucht-  
mitteln im Harn.  
Hoppe-Seyler's Ztschr.  
physiol. Chem., 292, 94  
(1953)
24. E. Vidic  
Die Anwendung papierchromatogra-  
phischer Methoden beim forensi-  
schen Suchtmittelnachweis.  
Arzneimittelforschung, 5,  
291 (1955)

25. D. Kraft Pharmazie, 8, 251 (1953)  
Zur papierchromatographischen  
Trennung von Alkaloiden.  
(Nikotin, Nornikotin u. Anabasin)
26. J.R. Geigy A.G. J.R. Geigy A.G. Basel  
Wissenschaftliche Tabellen Ausgabe 1953  
S. 72
27. H.F.W. Kirkpatrick Quart.J.Pharm.Pharmacol.,  
Zitat nach M.Brezina, P.Zuman: 20,87 (1947)  
"Die Polarographie in der Medizin,  
Biochemie und Pharmazie".  
Kapitel Alkaloide, S. 347 (6 g),  
(S.335)
28. M. Brezina, P. Zuman Akademische Verlagsges.  
Die Polarographie in der Medizin, Leipzig 1956  
Biochemie und Pharmazie.  
S. 347: Die katalyt. Wellen der  
Alkaloide.
29. A. Jindra, V. Junger, J. Zýka Cs. farmacie, 1, 177 (1952)  
Zitat nach M.Brezina, P.Zuman:  
"Die Polarographie in der Medizin,  
Biochemie und Pharmazie".  
S. 349 (S. 334)
30. G. Kahle, E. Reif Biochem.Ztschr., 325, 380  
Die Bestimmung von Kupfer, Blei (1954)  
und Zink im Blutplasma unter An-  
wendung der Polarographie und des  
Kationenaustauschers.
31. M. Brezina, P. Zuman Akad. Verlagsges. Leipzig  
Die Polarographie in der Medizin, 1956  
Biochemie und Pharmazie.  
S. 16
32. F. Sanger, H. Tuppy Biochem. Journ., 49, 463  
The amino-acid sequence in the (u. 466) (1951)  
phenylalanyl chain of insulin.
33. I.H. Pierce J. Lab. and Clin.Med., 26,  
The absorption of nicotine from 1322 (1941)  
cigarette smoke.
34. J.P. Baumberger J.Pharm.and Exp.Therap.,  
The nicotine content of tobacco 21, 35 (1923),  
smoke. 21, 47 (1923)  
The amount of smoke produced from  
tobacco and its absorption in  
smoking as determined by electri-  
cal precipitation.

35. A. Wenusch  
Über die Nikotinaufnahme beim Tabakrauchen. Med.Klin., II, (36), 1159 (1940)  
Über die absoluten Mengen des beim Rauchen aufgenommenen Nikotins. Forschungen u. Fortschritt, 18, 77 (1942)
36. W.E. Dixon  
Nikotin, Coniin, Piperidin, Lupe-  
din, Cytisin, Lobelin, Spartein,  
Gelsemin.  
Mittel, welche auf bestimmte Ner-  
venzellen wirken. Heffters Handb.d.Pharm.,  
2, 656 (683ff.) (1924)
37. E. Werle, H. Schievelbein,  
D. Spieth  
Zur Pharmakologie des Nikotins  
und zur Entgiftung des Nikotins  
durch den Organismus.  
(1. u. 2. Mitteilung) Arzneimittelforschung, 6,  
265 u. 322 (1956)
38. M. Biebl, H.E. Essex, F.C. Mann  
The role of the liver in the  
destruction or inactivation of  
nicotine. Amer.J.Physiol., 100, 167  
(1932)
39. E. Werle  
Über die Entgiftung von Nikotin  
durch tierisches Gewebe. Biochem. Z., 298, 268 (1938)
40. E. Werle, H.W. Becker  
Über eine Mikromethode zur Be-  
stimmung von Nicotin und ihre An-  
wendung zur Untersuchung der fer-  
mentativen Nicotinentgiftung durch  
tierisches Gewebe. Biochem. Z., 313, 182 (1942)
41. H.Mc. Kennis jr., L.B. Turnbull,  
T.R. Bowman  
Gamma-(3-pyridyl)-Gamma-methyl-  
aminobutyric acid as an urinary  
metabolite of nicotine. J.Amer.Chem.Soc., 79, 6342  
(1957)
42. P. Noether  
Quantitative Studien über das  
Schicksal des Nikotins im Orga-  
nismus nach Tabakrauchen. Arch.Exp.Path.u.Pharmakol.  
98, 370 (1923)
43. H. Jatzkewitz  
Überprüfung und Anwendung eines  
klinischen Verfahrens zur Bestim-  
mung von Suchtmitteln im Harn. Dtsch.Med.Wschr., 79, 541  
(1954)
44. O.M. Helmer, K.G. Kohlstaedt,  
I.H. Page  
The isolation of nicotine from  
human urine. Amer.Heart Journ., 17, 15  
(1939)

Dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin danke ich für die mir großzügigerweise zur Verfügung gestellten Apparate und Reagenzien.

Ganz besonders herzlich danke ich Herrn Dr. Heinz-Walter Raudonat für seine wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der Experimente und für seine Anregung zur gemeinsamen Diskussion.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank Herrn Dr. Günther Bohné für seine guten Hinweise sowie Herrn Dr. Eberhard Zimmermann für seine freundliche Anleitung bei der statistischen Auswertung.

### Lebenslauf

Am 14. Mai 1937 wurde ich als Tochter des Rechtsanwalts und Notars Kurt Müller und seiner Ehefrau Margarete geb. Schiller in Zeitz an der Elster geboren. Von 1943 bis 1949 ging ich dort in die Grundschule, da 1947 infolge des in der Sowjetzone eingeführten neuen Schulsystems eine Umschulung in die höhere Schule nicht möglich war. Ende 1949 folgte ich meinen Eltern nach Frankfurt/Main und besuchte hier ab Januar 1950 das Ziehen-Gymnasium. Nach dem Abitur im Frühjahr 1957 begann ich an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität mit dem Medizinstudium. Im Juli 1959 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab. Danach studierte ich je ein Semester an den Universitäten Innsbruck und Kiel und dann die letzten vier klinischen Semester wieder an der Universität Frankfurt/Main. Am 11. Februar 1963 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

Frankfurt/Main, den 29. Juli 1964

Renate Müller

## Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

### A. In den vorklinischen Semestern:

Czerny  
Felix  
Frick  
Giersberg  
Halbsguth  
Ortmann  
Ried  
Royen  
Starck  
Wezler  
Wieland

### B. In den klinischen Semestern:

( I = Innsbruck, K = Kiel )

|              |                   |
|--------------|-------------------|
| Altmafn, R.  | Mittermaier       |
| Amelung      | Müller (K)        |
| Artelt       | Otto              |
| Asperger (I) | Pfleiderer (K)    |
| Behrens (K)  | Philipp (K)       |
| Betke        | Radenbach         |
| Degkwitz     | v. Reckow         |
| Dörr (K)     | Reinwein (K)      |
| Frey         | Ruckensteiner (I) |
| Frowein      | de Rudder         |
| Gabl (I)     | Schinzl (I)       |
| Gärtner (K)  | Schmidt           |
| Graff, Th.   | Staemmler (K)     |
| Grüner       | Stange (K)        |
| Güntz        | Strnad            |
| Herzberg     | Tapfer (I)        |
| Hoff         | Thiel             |
| Hittmair (I) | Ungeheuer         |
| Huber (I)    | Wanke (K)         |
| Kahlau       | Weber, W.         |
| Konzett (I)  | Weiß              |
| Landes       | Weithaler (I)     |
| Lang (I)     | Westermann, E.    |
| Leubner (I)  | Wiedemann         |
| Lieb         | Zimmermann, H.    |
| Luff         | Zutt              |

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

" ÜBER VERSUCHE ZUR QUALITATIVEN NIKOTINBESTIMMUNG  
IM RAUCHERBLUT UND ZUM QUANTITATIVEN POLAROGRA -  
PHISCHEN NIKOTINNACHWEIS IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN

(Voruntersuchungen zur Erarbeitung einer  
quantitativen polarographischen Analysen-  
methode für Nikotin im Raucherblut) "

im Institut für Gerichtliche und Soziale Medizin der Universität zu Frankfurt/Main unter Leitung von Herrn Professor Dr. Gerchow mit Unterstützung durch Herrn Dr. Raundonat, Herrn Dr. Bohné und Herrn Dr. E. Zimmermann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ein Publikationsorgan für die vorliegende Arbeit wurde nicht bestimmt.

Frankfurt/Main, den 7.4.1964

Renate Jülicher





